

U. PORTO



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

Anémonas-do-mar: novas perspetivas biológicas



Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade

Área de Especialização: Fármacos e Plantas Medicinais

Tânia da Costa e Silva

Orientador: Professor Doutor David Alexandre Micael Pereira

Co-orientadora: Professora Doutora Paula Cristina Branquinho de Andrade

Porto, 30 de junho de 2016

Eu, Tânia da Costa e Silva, estudante de mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, número 201402464, assumo as responsabilidades pela originalidade desta dissertação conducente ao grau de mestre em Controlo de Qualidade. Autorizo ainda a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Os resultados dos trabalhos incluídos nesta dissertação de mestrado fazem parte das seguintes divulgações científicas:

- Silva T, Andrade P B, Valentão P, Pereira R B, Pereira D M (2016) Anti-inflammatory activity of aqueous extracts of sea anemones in macrophages – Encontro de Investigação Jovem da Universidade do Porto (IJUP) – de 17 a 19 de fevereiro 2016, Porto, Portugal
- Silva T, Paiva-Martins F, Valentão P, Andrade P B, Pereira D M (2016) Anticancer activity of extracts of sea anemones in human gastric adenocarcinoma cells - 5th Portuguese Young Chemists Meeting (5th PYCheM)/ 1st European Young Chemists Meeting – de 26 a 29 abril 2016, Guimarães, Portugal.
- Silva T, Paiva-Martins F, Valentão P, Andrade P B, Pereira D M (2016) Biologic effect of aqueous extracts of the edible sea anemones *A. sulcata* and *A. equina* in gastric and immune cells. Submetido

Agradecimentos

Quando no início parecia tão difícil começar a escrever esta dissertação de mestrado, apercebo-me de que agora no fim, tão ou mais difícil é agradecer a toda a gente que tornou todo este percurso de um ano mais fácil. A essas pessoas, por todo o amor, paciência e dedicação quero dedicar estas palavras.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, o Prof. Dr. David Pereira. Agradeço todo o conhecimento que me transmitiu, a dedicação no trabalho, as dúvidas esclarecidas, a disponibilidade imediata para ajudar mesmo quando o trabalho não o “deixava respirar”, a confiança que depositou em mim para levar a cabo todo o trabalho realizado de uma forma bastante independente e autónoma, a boa disposição e o otimismo que sempre revelou quando mais uma vez as dúvidas e as dificuldades apareciam. Foi um privilégio trabalhar consigo durante estes dois anos e sem dúvida alguma que me fez crescer como pessoa e sobretudo como investigadora. Acima de tudo este grau de mestre que agora vou obter, é também possível graças à sua incessante ajuda. Obrigada por tudo.

À Dra. Paula, minha co-orientadora, quero agradecer pela disponibilidade em me receber no seu laboratório, pela confiança depositada e por toda a disponibilidade dada para ajudar sempre que fosse necessário.

Aos restantes elementos do laboratório de Farmacognosia gostaria de agradecer, em especial à Dra. Patrícia Valentão por toda a disponibilidade demonstrada; à Dra. Andreia e à Dra. Fátima por todo o apoio e conhecimento dado durante este ano, pela disponibilidade, pelas gargalhas e boa disposição que sempre revelaram; ao Dr. Gonçalo pelos momentos de grande diversão, boa disposição e grande ajuda na etapa final deste trabalho; ao Dr. Romeu pela partilha de conhecimentos, simpatia e constante disponibilidade para ajudar; à Mariana, por toda a ajuda, disponibilidade, boa disposição e ajuda na integração no laboratório; à Cristina pela ajuda e boa disposição que sempre revelou.

À Ana Isabel, mais que uma amiga, um excelente apoio e ombro amigo quando tudo parecia desabar e as dúvidas (mais uma vez) voltavam a aparecer. És a prova viva de que a distância não faz sentido nenhum quando a palavra Amizade está presente. Obrigada por tudo e pelo que ainda está para vir.

Aos meus amigos Isabel, Marcelo, Eduardo e Paulo, os de há muito e que continuam a deixar grandes marcas na minha vida, mesmo quando a tese se colocava em primeiro lugar e os meus desabafos davam lugar às velhas histórias que tanto gostamos de contar. Obrigada pela paciência e por nunca desistirem de mim.

Às minhas eternas companheiras de mestrado Ana, Teresa, Beatriz, Catarina, Joana, Rita Pedro, Cíntia, Inês e Carina, que juntas formaram um pilar para todos os momentos difíceis, mas que também se fizeram presentes em todos os momentos de felicidade. As palavras ficam escassas quando encontramos amigas assim que nos fazem sorrir mesmo quando não existem motivos para tal. Obrigada por cada gargalhada dada, por servirem de “muro das minhas lamentações”, por me ouvirem e por tentarem sempre dar os melhores conselhos. Que esta amizade perdure pela vida. Obrigada também ao Titan, pois foi um grande Amigo durante este ano. Obrigada por toda a força, motivação, animo e conversas.

À minha grande companheira de tese, Daniela Correia. Para ti não existem palavras para expressar a minha gratidão para contigo. Foste uma pessoa que fui descobrindo aos poucos e que se revelou ser uma Grande Amiga. Obrigada por todo o companheirismo, por todos os momentos embaraçosos que partilhaste comigo, por todas as conversas, cafés, bolos e chocolates que dividimos, por todas as “cusquices” e sobretudo pela amizade. Foste um grande apoio e sem dúvida alguma uma grande ajuda para ter conseguido chegar até ao “fim”.

Ao Renato, porque a vida sabe sempre equilibrar o que nos tira e o que nos dá. Obrigada pela fantástica amizade, por todo o companheirismo, gargalhadas, boa disposição, motivação e conselhos. Obrigada por toda a ajuda dada para conseguir chegar aqui e por me fazeres acreditar em mim e nos meus sonhos.

Por fim, mas não menos importante, à minha família (pais e avós), os grandes pilares da minha vida. Agradeço por todo o amor e carinho dado, por todos os esforços possíveis e impossíveis de me fazerem chegar até aqui, pelo apoio incondicional, pela confiança que depositaram em mim e acima de tudo por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. Tudo o que eu sou, devo a vocês. Obrigada.

À memória do meu avô.

"Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo,- é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda."

Antoine de Saint-Exupéry

Índice Geral

Índice Geral	viii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xiv
Abreviaturas	xv
Unidades e convenções	xviii
Resumo	xix
Abstract	xx
Capítulo 1	1
1 - Fundamentos Teóricos	1
1.1 Animais Marinhos.....	1
1.1.1 Filo Cnidaria: Anémonas-do-mar - <i>Actinia</i> spp. e <i>Anemonia</i> spp.	2
1.2 Produtos Naturais: Metabolitos primários e secundários.....	7
1.2.1 Alcaloides	14
1.3 Atividade biológica	15
1.3.1 Cancro	16
1.3.1.1 Apoptose.....	18
1.3.1.1.1 Vias de sinalização envolvidas na morte celular	20
1.3.2 Inflamação	25
Capítulo 2	29
2 – Objetivos	29
Capítulo 3	30
3 – Materiais e métodos	30
3.1 Substâncias de referência.....	30
3.2 Síntese da homarina	30
3.3 Recolha das amostras e preparação dos extratos	31
3.4 Caracterização química dos extratos	31
3.4.1 Pesquisa de alcaloides.....	31
3.4.2 Análise de compostos por cromatografia líquida de elevada pressão com detecção por díodos (HPLC-DAD).....	33
3.5 Atividade enzimática	34
3.5.1 PLA ₂ do veneno de abelha	34

3.6 Cultura celular	34
3.6.1 Determinação da viabilidade celular: MTT	36
3.6.2 Avaliação da integridade membrana	37
3.6.3 Estudos morfológicos – coloração de Giemsa	37
3.6.4 Atividade das caspases	38
3.6.5 Espécies reativas de oxigénio	38
3.6.6 Determinação do óxido nítrico	39
3.7 Análise estatística	39
Capítulo 4	40
4 – Resultados e discussão	40
4.1 Caracterização química dos extratos	40
4.1.1 Pesquisa de alcaloides	40
4.1.2 Identificação química de compostos por HPLC-DAD	41
4.1.3 Quantificação da homarina nos extratos	43
4.2 Efeitos Biológicos em células gástricas	43
4.2.1 Efeitos citotóxicos	43
4.2.2 Avaliação da integridade membrana	45
4.2.3 Impacto na morfologia celular	46
4.2.4 Atividade das caspases	47
4.3 Efeitos Biológicos em macrófagos	51
4.3.1 Efeitos citotóxicos	51
4.3.2 Avaliação da integridade membrana	53
4.3.3 Atividade das caspases	55
4.3.4 Diminuição da produção do $\cdot\text{NO}$	57
4.3.5 Capacidade dos extratos para a diminuição da produção de EROs	60
4.4 Ensaio não celulares	61
4.4.1 Inibição da via do ácido araquidónico	61
Capítulo 5	64
5 – Conclusões finais e perspectivas futuras	64
Capítulo 6	67
6 – Bibliografia	67
Capítulo 7	80
7 – Anexos	80

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação das formas adultas pólipó e medusa, encontradas no filo Cnidaria. Retirado de (16).	4
Figura 2 - Taxa das duas espécies de anémonas-do-mar usadas ao longo deste trabalho: <i>A. sulcata</i> (A) e <i>A. equina</i> (B) - Origem das fotografias: Praia da Memória, Porto, por (A) Prof. David Pereira e (B) Dr. Renato Pereira, Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.	4
Figura 3 – Representação esquemática do organito cnidócito presente das anémonas-do-mar após ser libertado (A) e antes de ser libertado (B). Adaptado de (21)	5
Figura 4 - Representação de várias espécies de anémonas-do-mar com diferentes padrões e pigmentações (origem das fotos: (24, 25); origem da foto da direita: Praia da Memória, Porto, por Dr. Renato Pereira, Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto).....	6
Figura 5 – <i>Distribuição das diferentes classes de compostos bioativos encontrados em organismos pertencentes ao Filo Cnidaria nos anos de 2001 até 2011. Adaptado de (3) .</i>	7
Figura 6 – Principais aplicações biotecnológicas dos produtos naturais marinhos isolados de espécies pertencentes ao Filo Cnidaria. Adaptado de (3).....	8
Figura 7 – Esquema simplificado das principais vias biosintéticas envolvidas na produção de metabolitos secundários.....	9
Figura 8 – Representação das duas predominantes vias envolvidas no processo da apoptose: via intrínseca e extrínseca da apoptose.....	21
Figura 9 – Esquema representativo da via intrínseca da morte celular por apoptose.	23
Figura 10 – Esquema representativo da via extrínseca da morte celular por apoptose. .	24
Figura 11 -Variedade de distúrbios que levam à inflamação e principais doenças que advém da inflamação.	26
Figura 12 – Mecanismo de produção de mediadores pro-inflamatórios pela libertação do AA das membranas, através das duas principais vias que o envolvem, com a respetiva ação benéfica dos ácidos gordos ómega-3.	27
Figura 13 - Esquema representativo da montagem de um hemocitómetro (a) e da imagem observada ao microscópio do mesmo (b). Os círculos observados na imagem (b) são representativos dos quadrantes usados para a contagem das células viáveis. Adaptado de (171).....	35
Figura 14 – Redução do MTT a cristais de formazano.	36

Figura 15 – Resultados obtidos do ensaio decisivo dos alcaloides para o extrato aquoso de <i>A. sulcata</i> . (A) controlo, (B) reagente de Bertrand, (C) reagente de Dragendorff e (D) reagente de Mayer.	40
Figura 16 – Espectro UV-Vis do composto puro homarina obtido por HPLC-DAD com a respetiva estrutura química.	41
Figura 17 – Perfil cromatográfico dos extratos aquosos de <i>A. sulcata</i> (A) e <i>A. equina</i> (B) obtido pelo sistema de HPLC-DAD com deteção a 280 nm.....	42
Figura 18 – Reta de calibração das áreas de pico obtidas por HPLC-DAD para cada concentração de homarina com a respetiva equação da reta e coeficiente de correlação.	43
Figura 19 – Avaliação da viabilidade celular das células AGS expostas aos extratos aquosos de <i>A. equina</i> e <i>A. sulcata</i> (A) e ao composto puro homarina (B) durante 24 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 3 ensaios independentes realizados em triplicados.....	44
Figura 20 – Avaliação do efeito causado pelo controlo positivo triton X-100 a 1% durante 30 min na libertação de LDH para o meio extracelular. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 7 ensaios independentes realizados em triplicados.	45
Figura 21 – Avaliação da integridade da membrana de células AGS expostas aos extratos aquosos de anémonas-do-mar (A) e ao composto puro homarina (B) comparativamente às células controlo. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 3 ensaios independentes realizados em triplicados.....	46
Figura 22 – Ensaio de morfologia nas células AGS tratadas com extratos durante 24 h, usando o corante de Giemsa. Em (A) e em (B) observamos os efeitos causados pelos extratos aquosos comparativamente às células controlo (A). Em (C) visualizamos numa ampliação maior células rodeadas de estruturas compatíveis à de corpos apoptóticos. .	47
Figura 23 – Efeito do pan-inibidor de caspases Z-VAD.fmk na atenuação da morte celular de células AGS causada pelos extratos aquosos das duas espécies de anémonas-do-mar e do composto puro homarina incubados durante 8 h. A estaurosporina foi usada a 500 nM como controlo positivo para a ativação das caspases. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados.	48
Figura 24 – Atividade das caspases 3/7 em células AGS tratadas com estaurosporina (500 nM) durante 8 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados.....	49
Figura 25 - Atividade das caspases 3/7 em células AGS expostas aos extratos aquosos de <i>A. equina</i> (0,5 mg/mL) e <i>A. sulcata</i> (1 mg/mL) e ao composto puro homarina (1 mg/mL)	

durante 8 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 3 ensaios independentes realizados em triplicados.....	50
Figura 26 - Avaliação da viabilidade celular das células RAW 264.7 expostas aos extratos aquosos de <i>A. equina</i> e <i>A. sulcata</i> (A) e ao composto puro homarina (B) durante 24 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 3 ensaios independentes realizados em triplicados.....	51
Figura 27 - Avaliação da viabilidade celular das células RAW 264.7 pré-incubadas por 2 h com os extratos aquosos de <i>A. equina</i> e <i>A. sulcata</i> (A) e o composto puro homarina (B) e de seguida expostas ao LPS (1 μ g/mL) durante 22 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados. * estatística comparativamente ao controlo; # estatística comparativamente ao LPS.	52
Figura 28 - Avaliação do efeito causado pelo controlo positivo triton X-100 a 1% durante 30 min na libertação de LDH para o meio extracelular. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de pelo menos 4 ensaios independentes realizados em triplicados.	54
Figura 29 – Avaliação da integridade da membrana de células RAW 264.7 expostas aos extratos aquosos de anêmonas-do-mar (A) e ao composto puro homarina (B) comparativamente às células controlo. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 5 ensaios independentes realizados em triplicados.	54
Figura 30 – Efeito do pan-inibidor de caspases Z-VAD.fmk na reversão da morte celular de células RAW 264.7 causada pelos extratos aquosos das duas espécies de anêmonas-do-mar e do composto puro homarina, incubados durante 8 h. A estaurosporina foi usada a 500 nM como controlo positivo para a ativação das caspases. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados.	56
Figura 31 – Atividade das caspases 3/7 em células RAW 264.7 tratadas com estaurosporina (500 nM) durante 8 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados.	57
Figura 32 - Atividade das caspases 3/7 em células RAW 264.7 expostas aos extratos aquosos de <i>A. equina</i> (0,5 mg/mL) e <i>A. sulcata</i> (1 mg/mL) durante 8 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 3 ensaios independentes realizados em triplicados.	57
Figura 33 - Avaliação do efeito causado pelo LPS em células RAW 264.7 expostas ao agente agressor durante 22 h, na produção do \cdot NO. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 6 ensaios independentes realizados em triplicados.	59
Figura 34 - Avaliação do efeito causado pelos extratos aquosos de <i>A. equina</i> e <i>A. sulcata</i> e pelo composto puro homarina na produção do \cdot NO, em células RAW 264.7 estimuladas	

com LPS durante 22 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 5 ensaios independentes realizados em triplicados.	59
Figura 35 - Avaliação do efeito causado pelo LPS em células RAW 264.7 expostas ao agente agressor durante 22 h, na produção de EROs. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 6 ensaios independentes realizados em triplicados. 61	
Figura 36 – Avaliação dos efeitos dos extratos aquosos de anémonas-do-mar (A) e do composto puro homarina (B) em células estimuladas com LPS na produção de EROs intracelular. O ensaio foi realizado usando uma sonda fluorescente, a DCDHF-DA. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados.	61
Figura 37 – Avaliação da inibição da via do ácido araquidónico pelos extratos aquosos de anémonas-do-mar (A) e pelo composto puro homarina (B) num sistema não-celular. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados.	62
Figura 38 – Espectro de RMN do composto puro homarina obtido por síntese.	80

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais classes do filo Cnidaria e as respectivas ordens. Adaptado de (3). ...	3
Tabela 2 – Alguns dos metabolitos encontrados em anémonas-do-mar de diferentes espécies com a respetiva classe e referência.	11
Tabela 3 – Toxinas Nav de anémonas-do-mar com o respetivo nome, classificação da família de toxinas, e canais alvos.	12
Tabela 4 – Toxinas Kv de anémonas-do-mar com o respetivo nome, classificação da família de toxinas, e canais alvos.	13
Tabela 5 -Toxinas do tipo II de citolisinas de anémonas-do-mar com o respetivo nome e classificação da família de toxinas.	14
Tabela 6 – Toxinas de anémonas-do-mar não incluídas nas classificações anteriores...	14
Tabela 7 – Sistema em gradiente utilizado para a análise do composto homarina em ambos os extratos aquosos por HPLC-DAD.	33

Abreviaturas

AGS – células de adenocarcinoma gástrico humano

•NO – radical óxido nítrico

AA – ácido araquidónico

UV – ultravioleta

DNA – ácido desoxirribonucleico

Acetil-CoA – acetil-coenzima A

PLA – fosfolípase A

EPA – *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico

DHA – *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico

NF- κ B – fator nuclear Kappa B

ATP – adenosina trifosfato

Na⁺ – íão sódio

K⁺ – íão potássio

Ca²⁺ – íão cálcio

Mg²⁺ – íão magnésio

TNF – fator de necrose tumoral

Bax – proteína X associada à Bcl-2

Bak – antagonista à morte celular Bcl-2

Bad – proteína BH3-only antagonista de Bcl-2 de morte celular

Bid – domínio agonista interagindo com BH3

Bim – mediador da morte celular que interage com Bcl-2

HrK – Harakiri

PUMA – Modulador regulamentado-p53 da apoptose

Bcl-xL – isoforma longa de Bcl-2

A1 – Bcl-2 relacionado com o gene A1

Mcl-1 – leucemia de células mieloides 1

EROs – espécies reativas de oxigénio

TRAIL – fator de necrose tumoral relacionado com um ligando indutor da apoptose

EndoG – endonuclease G

AIF – fator indutor da apoptose

IAP's – inibidores de proteínas da apoptose

DcR – recetores funcionais e de armadilha (decoy)

FADD – Fas-proteína associada com domínio de morte

DISC – complexo de sinalização de indução de morte

tBid – Bid truncado

Apaf-1 – fator-1 apoptótico ativador da peptidase

IL – interleucinas

PGE₂ – prostaglandina E₂

MAPK – proteínas quinases ativadas por mitogéneos

PLA₂ – fosfolípase A₂

LOX-5 – lipoxigenase-5

COX-2 – ciclo-oxigenase-2

iNOS – síntese do óxido nítrico indutível

LPS – lipopolissacarídeo

DCHDF-DA – diacetato de diclorodihidrofluoresceína

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NADH – dinucleótido de nicotinamida e adenina

DMSO – dimetilsulfóxido

DMEM – meio Eagle modificado de Dulbecco's

FBS – soro fetal de bovino

Z-VAD.fmk – carbobenzoxi-valil-alanil-aspartil- [O-metil] -fluorometilcetona

CH₃CN – acetonitrilo

HCl – ácido clorídrico

RMN – ressonância magnética nuclear

H₂O – água

HPLC-DAD – sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com díodos

CO₂ – dióxido de carbono

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

NADH – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

LDH – lactato desidrogenase

HBSS – solução salina tamponada de Hank's

O₂^{•-} – radical anião superóxido

H₂O₂ – peróxido de hidrogénio

¹O₂ – dioxigénio singlete

OH[•] – radical hidroxilo

Unidades e Convenções

% - percentagem

KDa – KiloDalton

mg – miligramas

g – gramas

µg – microgramas

mL – mililitros

rpm – rotações por minuto

µm – micrómetros

min – min

h – horas

µL – microlitros

nm – nanómetros

µM – micromolar

mM – milimolar

pH – potencial de hidrogénio iónico

°C – graus Celsius

nM – nanomolar

Resumo

Os oceanos cobrem mais de 70% da superfície da terra e possuem uma grande variedade de organismos marinhos. A importância dos organismos marinhos como fonte de novos agentes bioativos tem vindo a ganhar destaque na área dos produtos naturais.

Vários metabolitos não essenciais à sobrevivência dos organismos têm apresentado um elevado potencial em diferentes áreas tais como a biomédica, farmacêutica, cosmética, alimentar e biotecnológica. Alguns desses metabolitos foram encontrados em anêmonas-do-mar, que pertencem ao Filo Cnidaria e que exibiram diferentes atividades tais como: anti-cancerígena e anti-inflamatória.

Apesar da crescente informação, algumas espécies como a *Actinia* sp. e *Anemonia* sp., requerem mais investigação. Assim, este trabalho iniciou-se pelo estudo do perfil metabólico de extratos aquosos de anêmonas-do-mar: *Actinia equina* (C. Linnaeus, 1767) e *Anemonia sulcata* (Thomas Pennant, 1777) capturadas na Praia da Luz, Porto e das suas possíveis atividades biológicas. Em ambos os extratos, o alcaloide homarina revelou ser o composto maioritário. De seguida estudaram-se os efeitos citotóxicos de ambos os extratos e do composto puro homarina em células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) e em macrófagos (RAW 264.7). Para tal, evidências apoptóticas foram procuradas através de observações morfológicas e o envolvimento das caspases foi estudado de forma a tentar elucidar os mecanismos envolvidos na morte destas células na presença dos extratos e da homarina. Além disto também foi estudada a atividade anti-inflamatória de ambos os extratos e do alcaloide homarina usando um modelo celular com as RAW 264.7 e um modelo não celular usando 2 enzimas envolvidas na produção de mediadores pro-inflamatórios.

Ambos os extratos revelaram toxicidade para as células AGS e o envolvimento das caspases na morte celular das células, sendo o extrato aquoso de *A. equina* aquele que obteve maior atividade, o mesmo tendo sido verificado com as células RAW 264.7. Relativamente à atividade anti-inflamatória o extrato aquoso de *A. sulcata* foi mais eficiente na redução do radical óxido nítrico (*NO) e o extrato aquoso de *A. equina* mais eficiente na inibição da via do ácido araquidónico (AA).

Palavras-chave: *A. equina* | *A. sulcata* | Anêmonas-do-mar | Apoptose | Caspases | Cnidaria | Homarina | Inflamação | NO | Organismos marinhos | Produtos naturais

Abstract

The oceans cover more than 70% of Earth's surface and possess a wide diversity of marine organisms. The relevance of marine organisms as source of new bioactive agents has gained prominence in the field of natural products.

Several secondary metabolites, non-essential to the survival of the producing organism, display a high potential in different fields, such as biomedicine, pharmaceutical, cosmetic, food and biotechnology. Notably, some of those promising metabolites on their chemical richness were isolated from sea anemones, which belong to the phylum Cnidaria, exhibiting pharmacologically relevant properties such as anti-cancer and anti-inflammatory.

In spite of the growing knowledge on their chemical richness, some species such as *Actinia* sp. and *Anemonia* sp. merit further investigation. Consequently, this work begun by studying the metabolic profile of aqueous extracts of the sea anemones *A. equina* and *A. sulcata*, captured in Praia da Luz, Porto, followed by the assessment of their possible biological activities.

In both extracts, the alkaloid homarine was identified as the major compound. Then, the cytotoxic effects of both extracts and of the pure compound homarine were evaluated, in human gastric adenocarcinoma cells (AGS) and in macrophages (RAW 264.7). For this purpose, apoptotic evidences were analysed through morphological observations, and caspase activity was studied, in order to elucidate the mechanisms which, underlie the death of these cells in the presence of the extracts and homarine. Furthermore, the anti-inflammatory activity of both extracts and homarine was also studied, both in a cellular model (RAW 264.7 macrophages) and in cell-free assay using two enzymes involved in the production of pro-inflammatory mediators.

Both extracts were found to be toxic against AGS cells, and caspases were involved in cell death, being that the aqueous extract of *A. equina* was the one inducing the larger increase in caspase activity, although this was not verified in RAW 264.7 cells.

Regarding the anti-inflammatory activity, the aqueous extract of *A. sulcata* was the most efficient in the reduction of the radical nitric oxide production, while the aqueous extract of *A. equina* proved to be the most efficient in the inhibition of the arachidonic acid pathway.

Keyword: *A. equina* | *A. sulcata* | Sea anemones | Apoptosis | Caspases | Cnidaria | Homarine | Inflammation | NO | Marine Organisms | Natural Products

Capítulo 1

1. Fundamentos teóricos

1.1. Animais marinhos

Ao longo dos tempos, a natureza tem vindo a revelar-se um foco importante como uma excelente fonte de novos compostos para uso na terapêutica (1). Durante muitos anos, as moléculas provenientes de plantas foram a única fonte de medicamentos para a terapêutica em humanos sob a forma de tinturas, extratos, pós, entre outros (2). No entanto, o desenvolvimento da medicina evoluiu para o uso de moléculas isoladas de origem vegetal e animal no contexto de uma formulação, em alternativa às misturas quimicamente complexas anteriormente usadas (2).

Os oceanos ocupam cerca de 71% da superfície da Terra possuindo um dos maiores e mais complexos ecossistemas, sendo o habitat de milhares de espécies e um reservatório de variabilidade química (1, 3). Consequentemente, os organismos marinhos, são uma excelente fonte de matéria-prima para a descoberta de novas entidades químicas com propriedades farmacológicas únicas, tanto para a terapêutica, como para a dieta humana e animal (3-5). Os organismos marinhos têm vindo a ganhar relevância enquanto fonte de novos agentes bioativos, justificando o interesse científico e económico nestes recursos em várias áreas como a agricultura, alimentação e indústria farmacêutica (1, 4-9). Contudo, apesar da sua vasta diversidade, os organismos marinhos continuam a ser pouco explorados comparativamente aos organismos terrestres (6).

Apesar de uma parte significativa das moléculas atualmente usadas como fármacos para fins terapêuticos serem semi-sintéticas, na sua maioria correspondem a moléculas derivadas, obtidas ou inspiradas em produtos naturais (10). É assim correto afirmar-se que, direta ou indiretamente, os compostos provenientes da Natureza continuam a ser a fonte predominante de compostos bioativos (2). É já constatável que os produtos naturais marinhos apresentam maior diversidade e complexidade química que os produtos naturais

terrestres, frequentemente caracterizados por longas cadeias, estruturas polimórficas complexas e comumente halogenados (8). O sucesso destas moléculas como candidatos clínicos emerge da organização estrutural dos seus átomos que normalmente apresentam vários centros assimétricos que lhes permite a ligação seletiva a vários alvos biológicos tridimensionais, exibindo consequentemente várias atividades biológicas (2).

Contudo o desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais é um processo bastante longo (normalmente 10 a 15 anos), uma vez que inicialmente estes compostos surgem em extratos que requerem a caracterização prévia de suas potenciais atividades biológicas através de ensaios *in vitro* (2). Após este processo, os extratos são fracionados para caracterização química e posterior identificação dos compostos responsáveis pela atividade biológica (2). Contudo, é importante salientar que usualmente este fracionamento da mistura de compostos de um extrato nos seus constituintes, resulta na perda de interações de vários compostos (sinergismos, antagonismos e potenciação) com um alvo biológico ou com uma via metabólica e não da atividade individual de cada um deles.

Nas últimas décadas, vários metabolitos descritos com diversas atividades biológicas têm sido isolados de organismos marinhos como as algas, esponjas e moluscos, assim como de microrganismos (6).

1.1.1. Filo Cnidária: Anémona-do-mar – *Actinia* spp. e *Anemonia* spp.

Existem evidências fósseis da existência do Filo Cnidária desde o período Pré-Cambriano, evidenciando uma estratégia evolutiva de sucesso, parcialmente derivada da produção de metabolitos secundários, permitindo a sobrevivência e adaptação à evolução dos ecossistemas marinhos (11). O corpo destes organismos marinhos é geralmente classificado de diploblástico, consistindo em duas camadas de células: a mais exterior, que cobre a superfície exterior do corpo, designada por ectoderme (epiderme), e a camada mais interior que reveste a cavidade do corpo, designada por endoderme (gastroderme) (11). Geralmente existem em mutualismo obrigatório com dinoflagelados (também designados por protistas flagelados) comumente designados de zooxantelas (género *Symbiodinium*), que pertencem ao plâncton marinho (mais especificamente ao fitoplâncton), sendo também ubíquos em águas doces (12, 13). As zooxantelas são um conjunto de organismos unicelulares fotossintéticos de coloração amarelada ou

acastanhada (12) que muitas vezes auxiliam outros organismos em defesas estratégicas devido ao seu papel proeminente na coloração brilhante que possuem (13).

Os animais pertencentes a este filo (como as medusas, corais e anêmonas-do-mar) são intermediários evolutivos entre esponjas (pertencentes ao filo Porifera) e animais com simetria bilateral, ocupando assim uma posição evolutiva chave (9). O filo Cnidária compreende assim animais aquáticos que vivem associados ao substrato (organismos bentônicos) e que não dependem dos fundos marinhos (organismos pelágicos) (11) sendo distribuídos por cerca de 11287 espécies foram reportadas até à data (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais classes do filo Cnidaria e as respectivas ordens. Adaptado de (3).

Filo	Classe	Ordem	
Cnidaria (≈ 11287 espécies)	Anthozoa (≈ 7500 espécies)	Actiniaria	Zoanthidea
		Antipatharia	Alcyonacea
		Ceriantharia	Gorgonacea
		Corallimorpharia	Helioporacea
		Scleractinia	Pennatulacea
	Cubozoa (≈ 36 espécies)	Carybdeida	Chirodropida
	Hydrozoa (≈ 3500 espécies)	Anthoathecata	Limnomedusae
		Leptothecata	Narcomedusae
		Siphonophorae	Trachymedusae
		Actinulida	
	Polypodiozoa (1 espécie)	Desconhecido (14)	
	Scyphozoa (≈ 200 espécies)	Coronatae	Semaestomeae
Rhizostomeae			
Staurozoa (≈ 50 espécies)	Stauromedusae		

De acordo com o seu ciclo de vida, na fase adulta estes podem ser pólipos ou medusas (Figura 1), sendo que os pólipos geralmente encontram-se associados à classe Anthozoa, enquanto que as medusas constituem as formas sexuais das restantes classes (15).

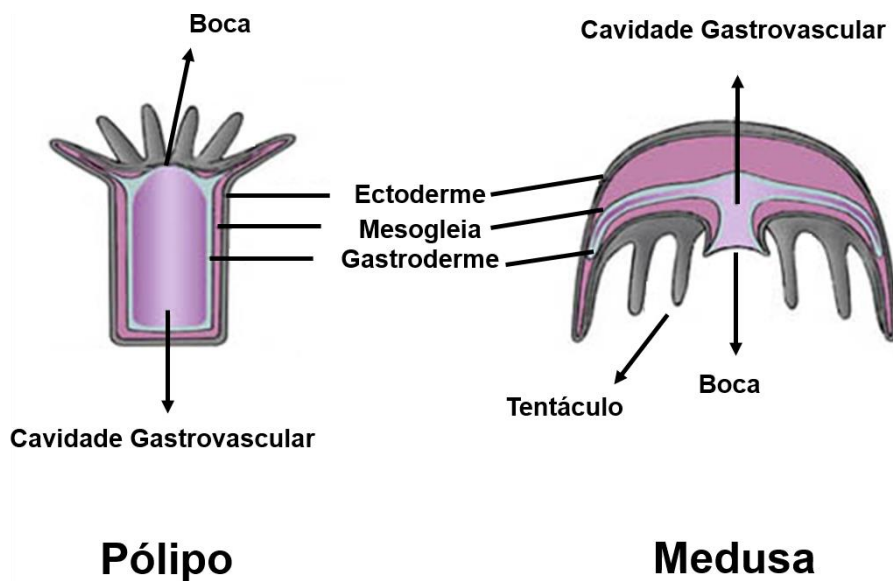


Figura 1 – Representação das formas adultas pólipos e medusa, encontradas no filo Cnidaria. Retirado de (16).

A classe Anthozoa, inclui a ordem Actiniaria (Figura 2) que inclui o grupo anêmonas-do-mar (3), inclusive as 2 espécies em estudo: *A. equina* (Figura 2(A)) e *A. sulcata* (Thomas Pennant, 1777) (Figura 2(B)).



Figura 2 - Taxa das duas espécies de anêmonas-do-mar usadas ao longo deste trabalho: *A. sulcata* (A) e *A. equina* (B) - Origem das fotografias: Praia da Memória, Porto, por (A) Prof. David Pereira e (B) Dr. Renato Pereira, Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

As anêmonas-do-mar são caracterizadas pela ausência de esqueleto e estão aderidos a um substrato rígido (12). Possuem um disco oral no qual está localizada a boca rodeada por tentáculos, usados para captura de alimentos e transporte destes até à boca (12).

Os tentáculos contêm células especializadas, designadas cnidócitos (Figura 3), que contêm um pequeno organito que se forma no seu interior, o nematocisto (17). A toxicidade das anêmonas-do-mar (e de outros organismos marinhos semelhantes) é parcialmente atribuída à presença deste organito (18) característico do Filo Cnidaria (11) uma vez que são fontes ricas em polipéptidos e proteínas que atuam como neurotoxinas, hemolisinas e enzimas (15). Para o ser humano são estruturas consideradas perigosas uma vez que após a picada causam inflamação, dando origem à dor, vermelhidão e edema característicos deste processo (19). As anêmonas-do-mar usam este organito para capturar e paralisar as presas como pequenos peixes e zooplâncton (12), e a sua libertação pode ser desencadeada por estimulação mecânica e/ou química (20). Existe uma grande quantidade de neuropéptidos e inibidores de proteases que têm sido isolados destes invertebrados, sendo que são necessários mais estudos para avaliar a importância destes em doenças do sistema nervoso central, tais como tumores cerebrais, certas formas de epilepsia e doença de Alzheimer (3)

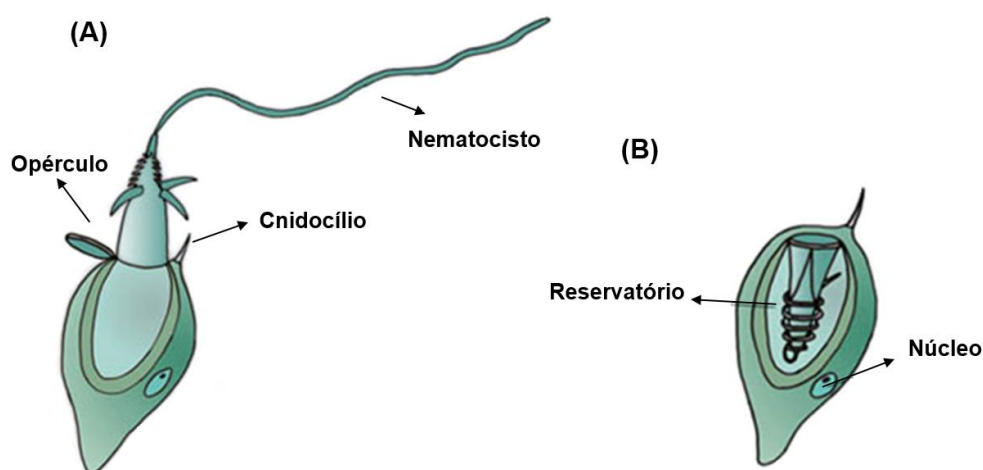


Figura 3 – Representação esquemática do organito cnidócito presente das anêmonas-do-mar após ser libertado (A) e antes de ser libertado (B). Adaptado de (21)

A maioria das anêmonas-do-mar é considerada hermafrodita, no entanto exibem uma ampla gama de estratégias sexuais uma vez que tanto a reprodução sexuada como assexuada pode ocorrer (22). Na reprodução sexuada o macho liberta o esperma que estimula a fêmea a libertar os seus óvulos, ocorrendo assim a fertilização. Tanto a libertação do esperma pelo macho como dos óvulos pela fêmea ocorre pela boca das

anêmonas-do-mar, a qual também funciona como ânus. Depois da fertilização, o zigoto transforma-se numa plânula que adere ao substrato e transforma-se numa anêmona-do-mar. A reprodução assexuada pode ocorrer por fissão binário, fragmentação e/ou gemulação.

As anêmonas-do-mar não possuem um sistema de resposta imune específica e a ausência de proteção física através um esqueleto mineralizado, leva a uma total dependência de defesas inespecíficas tais como a fagocitose, encapsulamento e a produção de metabolitos considerados como não essenciais à sua sobrevivência (metabolitos secundários) que servem como uma defesa química contra a predação, incrustações, infecção, condições adversas do meio ambiente, entre outros (9). Estes compostos apresentam frequentemente estruturas polinsaturadas conjugadas, provenientes de várias vias biossintéticas (13) que absorvem comprimentos de onda específicos, contribuindo assim para grande parte da coloração que estes seres apresentam (1). A presença destes pigmentos químicos é frequentemente associada aos mecanismos de defesa química destes organismos, bem como a processos fisiológicos tais como: absorção de calor e de oxigênio, digestão (13) reprodução assexuada (23) regeneração dos tecidos (13) e atividades biosintéticas de bactérias simbióticas (12). Além disto, a intensidade e os diferentes padrões dos pigmentos observados pelas diferentes espécies (Figura 4) podem depender de vários fatores tais como: fornecimento de alimentos, profundidade, intensidade da luz do meio ambiente e localização geográfica (13). Os carotenoides presentes nestas espécies têm sido descritos como responsáveis pelo polimorfismo de cores, estando também associados à proteção contra as radiações ultravioleta (UV), atuando como um filtro para a proteção das células de algas simbióticas nos tecidos destes seres (12).



Figura 4 - Representação de várias espécies de anêmonas-do-mar com diferentes padrões e pigmentações (origem das fotos: (24, 25); origem da foto da direita: Praia da Memória, Porto, por Dr. Renato Pereira, Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto).

Várias espécies pertencentes à classe Anthozoa são fontes ricas de metabolitos secundários tais como sesquiterpenos e esteroides (3). As toxinas libertadas por estes organismos têm sido alvo de bastantes estudos, uma vez que exibem efeitos

neurofisiológicos, incluindo o bloqueiam a transmissão neuromuscular (26). Apesar dos vários estudos realizados com anêmonas-do-mar, não existe nenhum estudo que caracterize a composição metabólica ou atividades biológicas de extratos aquosos de espécies da costa Portuguesa.

1.2. Produtos Naturais: Metabolitos primários e secundários

Os produtos naturais possuem grande diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que os tornam estruturas favoráveis ao desenvolvimento de novos fármacos (27). O estudo de compostos naturais marinhos tem sofrido um crescimento constante e bastante acentuado (1). Estes compostos têm vindo a ocupar um lugar bastante significativo enquanto catalisadores do desenvolvimento da Medicina, como similarmente para a indústria, uma vez que podem também ser usados como suplementos alimentares ou incorporados em diversos produtos cosméticos (1, 4). Além das suas numerosas propriedades benéficas estes produtos possuem também uma relevância económica considerável (1, 3, 4, 12, 28).

São vários os estudos que relatam diversas classes de compostos bioativos presentes em organismos pertencentes ao Filo Cnidaria (Figura 5) com elevado potencial em diversas áreas tais como farmacêutica e biotecnológica (3).

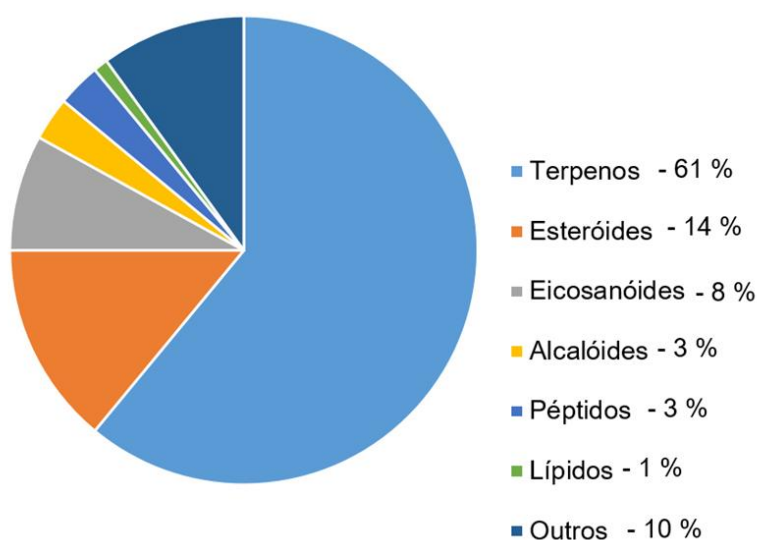


Figura 5 – Distribuição das diferentes classes de compostos bioativos encontrados em organismos pertencentes ao Filo Cnidaria nos anos de 2001 até 2011. Adaptado de (3)

Nos últimos anos, o número de novos compostos isolados de fontes marinhas tem aumentado de um modo acentuado, tendo sido identificados mais de 26,000 novos

compostos (1, 12). Apesar do número de agentes terapêuticos e candidatos clínicos para o tratamento de várias doenças a maioria encontra-se ainda em desenvolvimento pré-clínico (Figura 6) (3, 4).

Alguns produtos naturais marinhos são considerados como essenciais para a sobrevivência, crescimento, replicação e desenvolvimento dos organismos (tais como macromoléculas, hidratos de carbono, proteínas, ácidos gordos e ácidos nucleicos), sendo portanto metabolitos primários e formados por um número limitados de reações metabólicas (8, 29). Estes produtos são provenientes de diferentes vias metabólicas tais como a glicólise, ciclo de Krebs, entre outras (30). Quando os produtos naturais são encontrados única e exclusivamente em organismos ou grupo de organismos e não são essenciais ao crescimento e desenvolvimento destes, são considerados uma expressão de individualidade das espécies e são designados de metabolitos secundários (30). Estes compostos não são produzidos em todas as circunstâncias e, em muitos casos, é ainda desconhecida a sua função (8, 30).

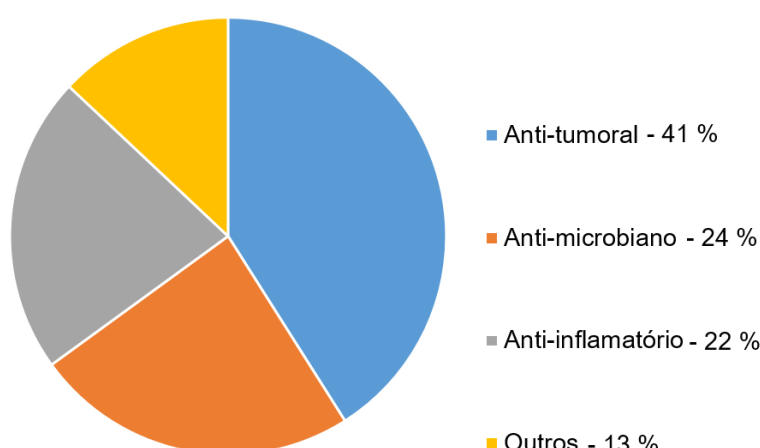


Figura 6 – Principais aplicações biotecnológicas dos produtos naturais marinhos isolados de espécies pertencentes ao Filo Cnidaria. Adaptado de (3).

No entanto, eles devem aumentar a aptidão de sobrevivência dos organismos, uma vez que a economia da vida subjacente ao processo evolutivo tende a maximizar energia e recursos e a minimizar o desperdício. Assim é possível racionalizar inúmeras vantagens resultantes de um metabolismo de produtos secundários, incluindo:

- Produção de compostos tóxicos fornecendo defesas contra predadores (4, 12, 31);

- Produção de compostos voláteis que podem atrair membros da sua ou de outras espécies (4, 12, 31, 32);
- Produção de compostos que atribuem pigmentações fortes aos organismos e que funcionem como estratégias de sobrevivência (12, 28, 30);
- Produção de compostos que estão envolvidos nas defesas abióticas tais como temperatura, humidade, salinidade, radiação UV entre outros (33).

Estes compostos podem estar relacionados com mecanismos evolutivos da própria espécie nomeadamente mutações e seleção natural, que podem influenciar certos alvos biológicos como o ácido desoxirribonucleico (DNA), enzimas, recetores, entre outros (34). Assim, o grupo de metabolitos secundários inclui a maioria dos produtos naturais com atividade farmacológica (30).

Alguns intermediários chave do metabolismo primário são estudados e explorados não apenas como processos de produção de energia, mas também de forma a produzir intermediários biosintéticos (muitas vezes designados por “*blocos de construção*”) que permitem a produção de metabolitos secundários (29). Os *blocos de construção* mais importantes na biossíntese dos metabolitos secundários são derivados a partir dos intermediários acetil-coenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalónico e o fosfato metileritritol (Figura 7) (30).

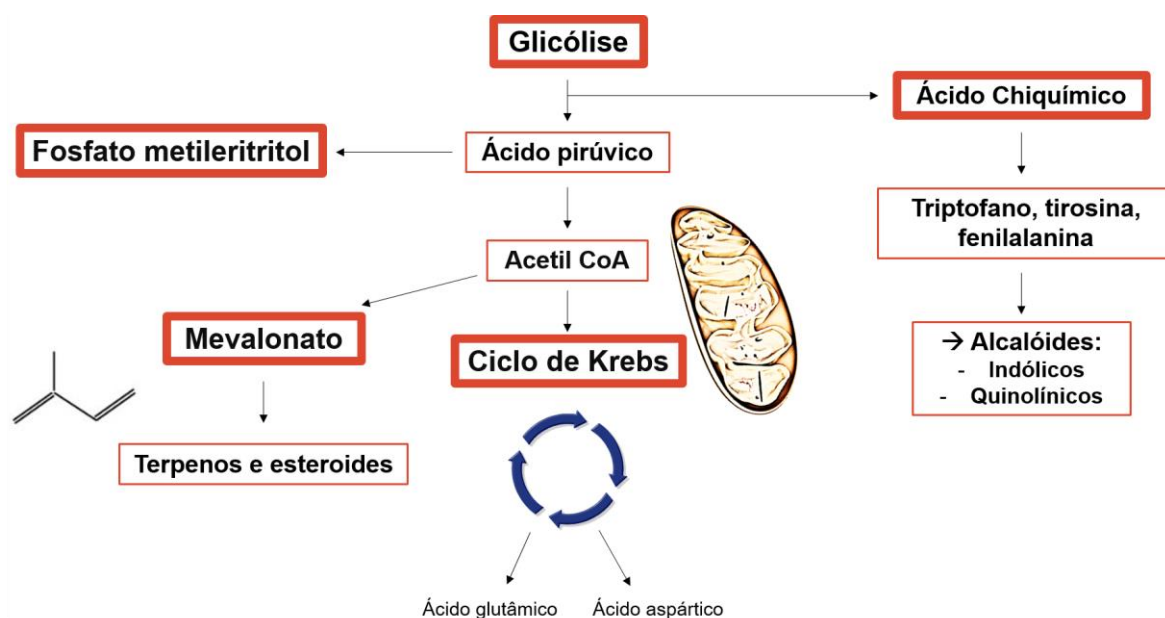


Figura 7 – Esquema simplificado das principais vias biosintéticas envolvidas na produção de metabolitos secundários.

A biossíntese dos metabolitos secundários envolve diferentes mecanismos e reações que são catalisadas enzimaticamente, utilizando vários mecanismos tais como: acilação, alquilação, descarboxilação, fosforilação, oxidação, redução, condensação e rearranjos, entre outros (29).

Ao longo dos tempos, têm sido vários os metabolitos encontrados em várias espécies de anémonas do mar como apresentado na Tabela 2.

Além dos metabolitos secundários aqui referidos, as anémonas-do-mar produzem uma grande variedade de substâncias biologicamente ativas designadas por toxinas, que modulam funções biológicas dos organismos que entram em contacto com estas, quer por contacto ou absorção (35-37). O veneno espalha-se assim por todo o corpo, servindo não só como repelente (defesa contra os predadores) mas principalmente ajudando na captura de presas (crustáceos e peixes pequenos) (15, 20, 34). Este veneno é introduzido nas presas através da libertação do nematocisto já referido anteriormente.

O fisiologista francês Charles Robert Richet, purificou, estudou e atribuiu o nome a dois componentes ativos, “congestina” e “talassina”, a partir de extratos dos tentáculos de anémonas-do-mar capturadas na Europa, principalmente *A. equina* mas também *A. sulcata* (38-40).

O veneno dos Cnidários ainda não é completamente conhecido, mas pensa-se que seja constituído por cerca de 100 compostos proteicos (como péptidos, proteínas e inibidores de proteinases) e não proteicos (como purinas, compostos de amónio quaternário, aminas biogénicas e betaínas) (15). As toxinas de anémonas-do-mar compreendem assim as toxinas dos moduladores dos canais de K^+ e Na^+ bloqueadores de tensão, toxinas dos canais iónicos de deteção de ácidos, citolisinas, toxinas com atividade inibitória de proteases do tipo Kunitz, e toxinas com atividade da fosfolípase A (PLA) (18, 19, 38-42). Estes canais iónicos são um alvo bastante comum para muitas toxinas peptídicas (18).

As neurotoxinas mais conhecidas produzidas por anémonas-do-mar são as toxinas dos canais de Na^+ , que impedem a inativação destes canais estabilizando conformações de estado aberto (20, 34, 35, 37). Atualmente é conhecido que este grupo de toxinas consiste em pelo menos 3 classes de péptidos: tipo I e II com 46 e 47 resíduos de aminoácidos, bem como cadeias β -antiparalelas e um *loop* altamente flexível com o nome de “arginina-14” (43), e o tipo III com 27 resíduos de aminoácidos (15, 20).

Tabela 2 – Alguns dos metabolitos encontrados em anêmonas-do-mar de diferentes espécies com a respetiva classe e referência.

Espécie	Composto	Classe	Referência
<i>Isactinia olivacea</i> (Hutton, 1878)	Não identificado	Carotenoides	(44)
<i>A. equina</i>	Actinioeritrina, α -carotenoide, β -carotenoide, violeritrina e 2-norastaxantina	Carotenoides	(45-47)
	Ácido láurico, mirístico, pentadecílico, palmítico, margárico, palmitoleico, cis-9-heptadecenóico, oleico, eicosenóico, docosenóico, cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (EPA)	Ácidos gordos	(48, 49)
	Sulcatoxantina e Hidratoperidinina	Carotenoides	(50-52)
<i>A. sulcata</i>	Ácido láurico, mirístico, pentadecílico, palmítico, oleico, margárico, eicosenóico, docosenóico e EPA	Ácidos gordos	(48, 49)
<i>Metridium senile</i> (Linnaeus, 1761)	Astaxantina	Carotenoides	(23)
	Epidioxie esterol	Esteróis	(53)
	Ácido palmítico, esteárico, oleico, EPA, 7,10,13,16-docosatetraenóico, cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (DHA)		(54)
<i>Tealia felina</i> (Linnaeus, 1767)	Actinioeritrina e 2-norastaxantina	Carotenoides	(47)
<i>Anthopleura midori</i> (Uchida & Muramatso, 1958)	Hidratoperidinina	Carotenoides	(55)
	5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,24(28)-dien-3 β -ol, colestano-3 β ,5 α ,6 α -triol, ergosta-5,24(28)-dien-3 β -ol, ergosta-5,22,24(28)-trien-3 β -ol e colest-5-en-3 β -ol	Esteróis	(55)

Ao contrário do tipo de toxinas I e II que são bastante comuns, as toxinas do tipo III foram identificadas apenas para algumas espécies (15). A tabela 3 mostra as toxinas do canal de Nav para as diferentes espécies de anêmonas-do-mar.

Tabela 3 – Toxinas Nav de anêmonas-do-mar com o respetivo nome, classificação da família de toxinas, e canais alvos.

Espécie	Toxina	Família de Toxinas	Alvo	Referência
<i>A. equina</i>	Ae I	Tipo I	-	(56)
<i>Anemonia erythraea</i> (Hemprich & Ehrenberg, 1834)	AETX-I	Tipo I	-	(57)
<i>Anemonia viridis</i> (Forsk., 1775)	ATX-I	Tipo I	Na _v 1	(58)
	ATX-II		-	(59)
	ATX-III	-	Na _v 1	(60)
	ATX-V	Tipo I	-	(61)
<i>A. sulcata</i>	ATX-Ia	Tipo I	-	(62)
	ATX-Ib		-	(62)
	ATX-II		-	(63)
	ATX-V		-	(61)

Outras toxinas produzidas por anêmonas-do-mar são as que modulam os canais de K⁺ que incluem as bloqueadoras Kv1 que se tornaram ferramentas experimentais valiosas com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos imunossupressores (35). Estas podem ser agrupadas em 4 classes estruturais: tipo I com 35-37 resíduos de aminoácidos e 3 pontes de dissulfeto, do tipo II com 58-59 resíduos de aminoácidos e 3 pontes de dissulfeto (que são homólogas aos inibidores do tipo de Kunitz de proteases de serina), do tipo III com 41-42 resíduos de aminoácidos e 3 pontes de dissulfeto e do tipo IV com 28 resíduos e 2 pontes dissulfeto (15). A tabela 4 mostra as toxinas do canal de Kv para as diferentes espécies de anêmonas-do-mar.

Outras toxinas têm sido identificadas em espécies distintas, nomeadamente: *Radianthus magnifica* (Quoy & Gaimard, 1833) em 1997 (64), *Anthopleura elegantissima* (Brandt, 1835) em 2003 e 2004 (65, 66), *Antheopsis maculata* (Rafinesque, 1815) em 2005 (67), *Bunodosoma caissarum* (Corrêa, 1987) em 2006 e 2008 (68, 69) e *Stichodactyla haddoni* (Saville-Kent, 1893) em 2008 (70).

Tabela 4 – Toxinas Kv de anêmonas-do-mar com o respetivo nome, classificação da família de toxinas, e canais alvos.

Espécie	Toxina	Família de Toxinas	Alvo	Referência
<i>A. equina</i>	AeK	Tipo I	K _v 1	(71)
	SA5 II	Inibidores de proteinases do tipo Kunitz/Tipo II	-	(72)
<i>A. viridis</i>	Kalicludin-1	Inibidores de proteinases do tipo Kunitz/Tipo II	K _v 1.2	(73)
	Kalicludin-2			
	Kalicludin-3			
	BDS-I		K _v 3.1, 3.2, 3.4	(74)
	kaliseptin	Tipo I	K _v 1.2	(73)
	BDS-II	Tipo III	K _v 3.1, 3.2, 3.4	(74)
<i>A. erythraea</i>	AETX-K	Tipo I	K _v 1	(75)

Outras toxinas de anêmonas-do-mar são as citolisinas que foram classificadas com 4 grupos polipeptídicos, com base na estrutura primária e propriedades funcionais (15). As do tipo I possuem 5-8 kDa de péptidos que formam poros em membranas contendo fosfatidilcolina e têm atividade anti-histamínica (76). Além disso, são menos ativos que as toxinas do tipo II e III, possuindo resíduos de cisteína mas não de triptofano (18). As toxinas do tipo II possuem 18-20 kDa de péptidos, possuem pontos isoelétricos elevados (> 9.5) e interagem com a esfingomiélinas nas membranas celulares (35). São também designadas de actinoporinas devido à sua capacidade de se ligarem aos domínios dos fosfolípidos da membrana do organismo hospedeiro e também porque funcionam através da formação de poros na membrana celular (18, 20, 35). As toxinas do tipo III tem 30-40 kDa de péptidos e são formadas por citolisinas com ou sem atividade na PLA (35). As toxinas do tipo IV são citolisinas com 80kDa (76). O único representante deste grupo de toxinas até agora, corresponde à toxina metridiolisina, produzida pela anêmona-do-mar *M. senil* (15, 76). A tabela 5 mostra as citolisinas do tipo II para diferentes espécies de anêmonas-do-mar.

Até 2005 a maioria das toxinas produzidas por anêmonas-do-mar foram isoladas de extratos do animal completo, dos tentáculos ou do próprio muco secretado. Contudo, Honma (19) foi capaz de isolar toxinas do acrorragi das anêmonas-do-mar.

Tabela 5 -Toxinas do tipo II de citolisinas de anêmonas-do-mar com o respetivo nome e classificação da família de toxinas.

Espécie	Toxina	Família de Toxinas	Referência
<i>A. equina</i>	Equinatoxina-I	II	(77)
	Equinatoxina-Ia		(77, 78)
	Equinatoxina-II		(77)
	Equinatoxina-III		(79)
	Equinatoxina-IV		(80)
	Equinatoxina-V		(42)
<i>Actinia fragacea</i> (Tugwell, 1856)	Fragaceatoxina C	II	(81)
<i>Actinia tenebrosa</i> (Farquhar, 1898)	Tenebrosina-A	II	(82)
	Tenebrosina-B		

Existem toxinas adicionais que ainda não estão incluídas em qualquer tipo de classificação, pois ainda não foram caracterizadas, contudo já foram identificadas como podemos observar pela Tabela 6.

Tabela 6 – Toxinas de anêmonas-do-mar não incluídas nas classificações anteriores. O nome e a característica da toxina que as distingue das outras estão expressos na tabela.

Espécie	Toxina	Características	Referências
<i>A. equina</i>	Acrorhagina 1	Produzida pela acrorhagi	(82)
	Acrorhagina 1a		
	Acrorhagina 2a		
<i>A. erythraea</i>	AETX-II	Tipo de toxina desconhecido – sugerem ser uma neurotoxina	(57)
	AETX-III		

1.2.1. Alcaloides

Os alcaloides são compostos que contêm átomos de azoto numa estrutura cíclica, sendo biossinteticamente formados a partir de um aminoácido, e que ocorrem naturalmente em plantas, mas também em microrganismos, organismos marinhos e animais terrestres (83).

São muitas vezes úteis como fármacos ou sondas biológicas para estudos fisiológicos (83). A importância dos alcaloides bioativos tem aumentado em todo o mundo devido à sua potencial aplicação na quimioterapia (84)

Os alcaloides obtidos a partir de organismos marinhos possuem frequentemente estruturas que não são encontradas em organismos terrestres (85). Os alcaloides bromopirrólicos constituem uma família reportada exclusivamente de organismos marinhos e representam uma enorme variedade de compostos com diferentes atividades biológicas, nomeadamente anti-cancerígenas, anti-inflamatórias, antimicrobiana, entre outros (86). Os alcaloides indólicos representam o maior número de alcaloides marinhos tendo exibido várias atividades biológicas como antibacteriana e anti-inflamatória (85).

A morfina foi o primeiro alcaloide extraído de uma planta terrestre em 1805 como foi relatado por Kappelmeyer e a hordenina o primeiro alcaloide isolado a partir de uma alga marinha em 1969 (87, 88).

Em tecidos de espécies de anêmonas-do-mar como a *A. equina* o alcaloide homarina foi detetado numa concentração de 1,5 e 2,1 mg/g de peso seco (89). A homarina foi isolada pela primeira vez em 1933 por Hoppe-Seyler (90) e o seu nome deriva da sua descoberta em tecido da lagosta *Homarus vulgaris* (H. Milne Edwards, 1837) (89). A sua função biológica foi bastante discutida desde então (91).

Este alcaloide parece estar restrito aos organismos marinhos sendo que no reino metazoa a homarina apenas é encontrada em invertebrados (92) existindo evidências que apenas possui a função de osmorregulação (91). Berris (93) estudou a presença da homarina em crustáceos, equinodermes e tunicados, concluindo que a sua presença nestes organismos tinha como função fenómenos osmóticos. Berking (94, 95) identificou a homarina em vários organismos pertencentes à classe Hydrozoa onde afirma que esta tem como função regular a morfologia das colónias de larvas e impedir a sua metamorfose. O alcaloide homarina foi também identificado numa espécie de tunicado *Symplegma rubra* (Monniot, C., 1972) e isolado a partir da alga vermelha *Tichocarpus crinitus* (Ruprecht, 1850), músculos de crustáceos, quatro espécies de anêmonas-do-mar incluindo a *A. sulcata*, entre outras espécies de bivalves e moluscos (26).

1.3. Atividade biológica

Os produtos naturais têm estado na vanguarda da investigação realizada com vista ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (8). Vários metabolitos secundários, tais como diterpenos, sesquiterpenos, furanoditerpenos, e esteroides encontrados em

vários organismos marinhos demonstraram várias atividades biológicas tais como: inibição do vírus da imunodeficiência humana (96), anti-inflamatória (97), anti-cancerígena (98) e anti-microbiana (99) sendo que alguns já se encontram em desenvolvimento pré-clínico ou clínico (34). Ao longo deste trabalho será dado maior ênfase à atividade anti-cancerígena e anti-inflamatória, em função do plano de trabalho seguido.

1.3.1. Cancro

O Cancro é considerado uma das principais causas de morte (100), sendo que em 2013 foi responsável por 14,9 milhões de novos casos e por 8,2 milhões de mortes no mundo (101). Estudos epidemiológicos demonstram que a mortalidade associada ao cancro aumentou de 12% em 1990, 15% em 2013 (101). O cancro do estômago é a segunda principal causa de morte quando comparada com o total de mortes por cancro (102).

O termo cancro é genérico para um grande número de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo sendo muitas vezes designado por tumores malignos e/ou neoplasias (103).

O cancro do pulmão, próstata, colo-retal, estômago e fígado são os mais comuns em indivíduos do sexo masculino, enquanto o cancro da mama, colo-retal, pulmão, colo do útero e estômago são os mais comuns em indivíduos do sexo feminino (103). Em qualquer dos casos, são caracterizados por uma proliferação anormal e não controlada de células anaplásicas que têm a tendência de invadir os tecidos adjacentes ou até mesmo a metastizar por órgãos e tecidos não adjacentes à lesão primária espalhar-se por outros locais mais distantes do corpo (100). Este processo é considerado como uma das principais causas de morte por cancro (103).

O aparecimento de cancro pode ter origem num conjunto de fatores que tanto podem ser externos (como por exemplo tabagismo, álcool, produtos químicos, agentes infecciosos, aditivos alimentares e radiação) como internos (alterações hormonais, condições imunes e mutações hereditárias) os quais provocam uma mutação no DNA cromossômico de uma célula normal (100). O mais frequente é a existência de mutações que criam o aumento da susceptibilidade, desenvolvendo-se o cancro através de fatores externos (104).

Cerca de 30% das mortes por determinados tipos de cancro podem ser evitadas através da modificação de determinados hábitos alimentares como por exemplo uma alimentação rica em fibras em que abundem os alimentos frescos e as frutas e que seja

pobre em gorduras, a não ingestão de álcool ou a sua ingestão em baixas quantidades, o combate à obesidade, a abstenção de fumar, a proteção contra a exposição à luz solar, a proteção contra poluentes ambientais e/ou profissionais entre outros (103, 104). Além disto, a detecção precoce e um diagnóstico preciso, aumentam as taxas de sobrevivência. Dados da Organização Mundial de Saúde indicam um aumento de 70% do número de novos casos de cancro, para os próximos vinte anos.

A investigação que tem sido feito na descoberta e desenvolvimento de novos compostos citotóxicos tem originado várias terapêuticas anti-cancerígenas, uma vez que estes compostos exercem um efeito tóxico nas células cancerígenas impedindo o seu rápido crescimento e divisão (mitose) (105) ou causando danos celulares irreparáveis que desencadeiam a apoptose e outros tipos de morte celular (106). Como tal, a eficácia de um determinado tratamento depende não só dos danos celulares que provoca, mas também da capacidade de resposta aos danos ocorridos pela ativação da apoptose (106). Assim, é possível afirmar que um potencial agente anti-cancerígeno deve de inibir, retardar ou reverter a progressão das células cancerígenas através do seu efeito citotóxico ou citostático ou por propriedades indutoras da apoptose (105, 107). Grande parte dos tratamentos anti-cancerígenos atuais incluem a morte das células por indução direta da apoptose sendo que também podem exibir um efeito citostático, retardando e/ou impedindo o desenvolvimento do tumor (2, 108). Contudo este último é considerado como inespecífico, uma vez que leva à lise de células neoplásicas e normais, que tenham sido atacadas pelo fármaco. Neste caso o fármaco atua de uma forma independente das caspases.

Devido à eficácia limitada dos atuais tratamentos, nomeadamente a resistência à apoptose por parte das células (109), tem sido dado ênfase a outro tipo de terapêuticas, nomeadamente que levem à lise de células neoplásicas e normais, que sejam atacadas pelo fármaco. Neste caso o fármaco atua de uma forma independente das caspases. Apesar disto, muitos fármacos têm destaque pela sua elevada especificidade para a ação citotóxica em células cancerígenas, minimizando os danos nas células normais (3, 105). Vários compostos de origem marinha encontram-se em desenvolvimento clínico ou pré-clínico como anti-cancerígenos, apesar de apenas alguns derivados marinhos se encontrarem atualmente no mercado (3, 8, 110). Um exemplo disso é o Yondelis® que possui como substância ativa o alcaloide trabectedina (111). Apesar do isolamento a partir do tunicado *Ecteinascidia turbinata* (Herdman, 1880), a trabectedina é atualmente obtida por semi-síntese através de um metabolito bacteriano (112). Além disto, compostos triterpénicos têm sido descritos com atividade anti-cancerígena devido ao seu efeito citotóxico contra uma variedade de células tumorais, uma vez que têm a capacidade de

bloquear a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), induzir a apoptose, inibir a transdução de sinal e ativar a transcrição e a angiogénese (105). Contudo, alguns tratamentos que usam determinados agentes citotóxicos são universalmente aplicados no tratamento do cancro, mas explorados e usados para o tratamento seletivo de determinadas células tumorais aumentando assim a seletividade dos tratamentos (105). Atualmente tratamentos como a cirurgia, quimioterapia e radioterapia são alguns dos recursos disponíveis e usualmente utilizados.

1.3.1.1. Apoptose

A agressão a uma determinada célula pode originar vários processos como a necrose celular, paragem temporária do ciclo celular, acumulação de lesões do DNA ou originar uma evolução para um processo de morte celular programada designada por apoptose (104).

A apoptose é uma forma de morte celular que requer o gasto de energia (adenosina trifosfato (ATP)) e que obedece a mecanismos de regulação mediados por estímulos fisiológicos (p.ex. níveis hormonais) e/ou patológicos (113). É um mecanismo de morte celular programada uma vez que é iniciada pela ativação de caspases (protéases) (104) e é necessário para a manutenção e desenvolvimento normal dos tecidos, dado que está relacionado com a homeostasia dos organismos e com estímulos patológicos (108, 109, 114). É também um processo através do qual as células envelhecidas, com danos e/ou mutações ou que não são desejadas, são eliminadas (115) de forma a existir um equilíbrio com a divisão celular (113). Todos estes processos são rigorosamente controlados de forma a causar o menor impacto possível às células vizinhas (113).

A ocorrência de anomalias durante a apoptose podem levar ao aumento da morte celular caracterizada por uma enorme variedade de desordens, incluindo a rejeição de transplantes, síndrome da imunodeficiência adquirida, insuficiência cardíaca (116), doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e de Parkinson, e a esclerose lateral amiotrófica (106). Anomalias que levam a uma diminuição e/ou inibição da apoptose tem sido verificada em doenças auto-imunes como o lúpus, infeções virais e cancro (117, 118). Contudo, podem também ocorrer mutações durante a apoptose que pode resultar na resistência a determinados fármacos levando assim à falha dos tratamentos.

Outros processos de morte celular como a necrose requerem e regulação de genes, no entanto sem cumprir alguns critérios morfológicos verificados na apoptose (109) como por exemplo o aparecimento de edema mitocondrial e a conservação do núcleo (104).

Contudo, a necrose não é o mecanismo de morte celular ideal uma vez que causa complicações como a inflamação, que é consequência da perda da integridade da membrana plasmática, seguindo-se uma dispersão do conteúdo intra-celular para o ambiente celular envolvente (119). Normalmente, a mesma substância pode causar tanto necrose como apoptose ou outro tipo de morte celular, dependendo da concentração na qual está a ser usada (120).

A apoptose é um dos principais tipos de morte celular, tratando-se de um processo altamente regulado por mudanças morfológicas que já se encontram bem descritas (108). Foi primeiramente descrito por Carl Vogt em 1842 (118), mas o conceito de “morte celular programada” foi introduzido apenas em 1965 por Lockshin e Williams (121, 122). O termo apoptose (a-po-toe-sis) foi apenas introduzido em 1975 por Kerr e seus colaboradores (123) que descreveram uma série de mudanças morfológicas similares às descritas por Lockshin e Williams: inicialmente ocorre a formação de vesículas membranares sem perda da integridade (2), condensação da cromatina nuclear (114) seguida de condensação do citoplasma, degradação do DNA e clivagem internucleossomal do DNA genómico levando à formação de corpos apoptóticos (104, 109). Esta clivagem internucleossomal é mediada por uma endonuclease endógena dependente de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ que ataca o DNA de ligação entre os nucleossomas (104). Os corpos apoptóticos formados a partir de organelos citosólicos que fragmentam núcleos condensados não são mais do que vesículas ligadas à membrana que contêm vários conteúdos celulares (2), e que são fagocitados por células vizinhas (macrófagos) e digeridos no seu lisossoma sem desenvolvimento de resposta inflamatória (124). Estas avaliações morfológicas têm sido consideradas como um método fácil para a identificação preliminar de evidências da apoptose (109). Contudo, mudanças bioquímicas são sempre necessárias para uma elucidação precisa do mecanismo pro-apoptótico (125), como por exemplo a clivagem da cadeia dupla nas regiões ligantes entre os nucleossomas, levando assim à formação de múltiplos fragmentos de DNA, utilização de sondas fluorescentes para núcleos condensados, exteriorização da fosfatidilserina e mudanças na expressão de vários genes e proteínas (126).

A morte celular por apoptose distingue-se assim da morte celular por necrose não só por alterações morfológicas, mas também pela ausência de um processo inflamatório associado (109).

Compostos que interferem com a via da apoptose são muitas vezes usados como abordagens terapêuticas em oncologia, uma vez que anomalias na apoptose são fulcrais no crescimento de tumores (127) e no desenvolvimento de resistência a terapias anti-cancerígenas (108). Assim, novos alvos da via apoptótica podem ajudar no tratamento de

certos tipos de cancro bem como reverter a resistência a outros fármacos ou, até mesmo induzir sensibilidade nos tratamentos atuais.

1.3.1.1.1. Vias de sinalização envolvidas na morte celular

A apoptose pode ter várias origens e seguir 2 vias distintas: a via intrínseca, mediada pela mitocôndria, e a via extrínseca, mediada por fatores externo à célula que ativam as caspases.

Alguns fármacos anti-cancerígenos, radiação gama e UV, carência de fatores de sobrevivência tais como interleucina-1 e várias outras citocinas que ativam “recetores de morte”, tais como Fas e recetores do fator de necrose tumoral (TNF), são considerados como iniciadores da apoptose (109). A mitocôndria e recetores da superfície celular medeiam as duas principais vias da apoptose (2, 106): a via intrínseca e a extrínseca (Figura 8) (108).

A via intrínseca é considerada bastante importante na resposta ao tratamento do cancro sendo mediada por proteínas da família Bcl-2 (106). A família de proteínas Bcl-2 é a mais estudada sendo que algumas são:

- pro-apoptóticos ou “genes de morte” como é o caso da proteína X associada à Bcl-2 (Bax), antagonista à morte celular Bcl-2 (Bak), proteína BH3-only antagonista de Bcl-2 de morte celular (Bad), domínio agonista interagindo com BH-3 (Bid), mediador da morte celular que interage com Bcl-2 (Bim), Bik, Harakiri (Hrk), modulador regulamentado-p53 da apoptose (PUMA) e a Noxa (2, 106)
- anti-apoptóticos ou “genes de sobrevivência” como é o caso da isoforma longa de Bcl-2 (Bcl-xL), Bcl-2 relacionado com o gene A1 (A1) e leucemia de células mieloides 1 (Mcl-1) (128).

A principal função das proteínas anti-apoptóticas é a de manter a integridade da membrana mitocondrial externa (108). Tendo em conta a presença de Bcl-2 em organelos conhecidos por participar em reações de oxidação-redução e na formação de espécies reativas de oxigénio (EROs) (129), alguns modelos de estudo propõem que a Bcl-2 possui propriedades antioxidantes e inibe a morte celular programa, suprimindo a formação e/ou o efeito provocado pelas EROs (130, 131). A Bcl-2 pode assim estar envolvida na proteção das células contra oxidantes citoplasmáticos envolvidos na mediação da morte celular por

apoptose, e/ou a partir da formação de EROs como um produto final das reações mitocondriais durante síntese de ATP (115).

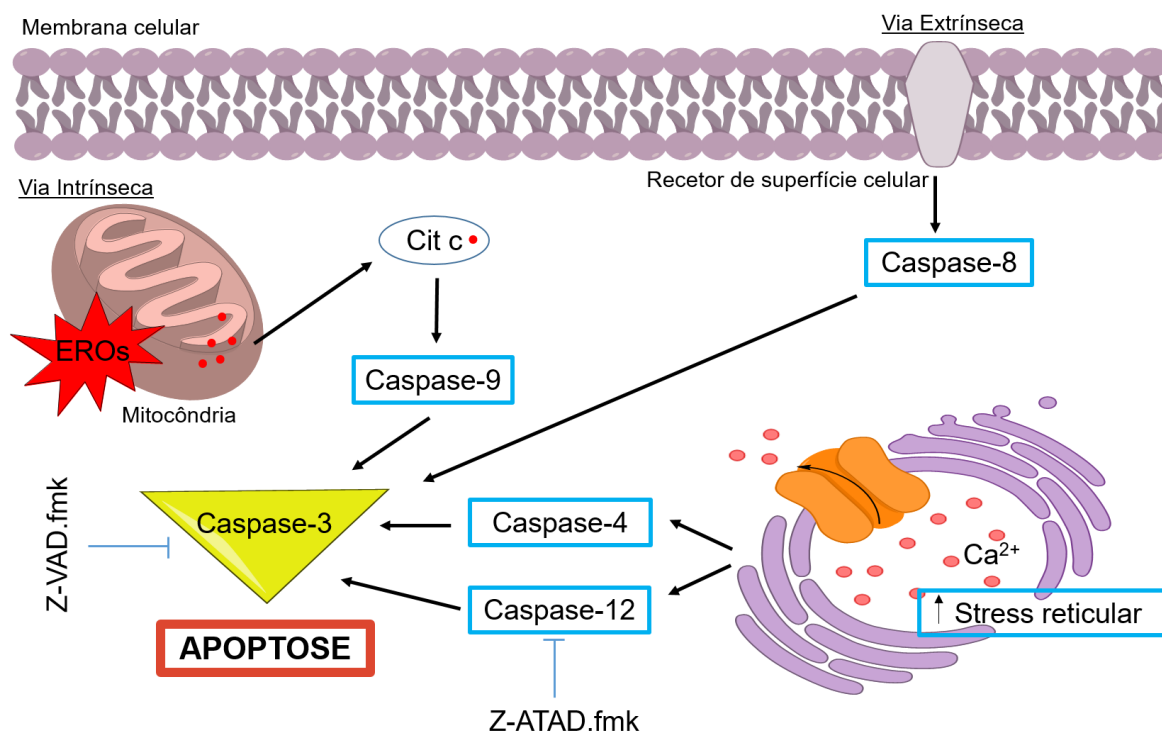


Figura 8 – Representação das duas predominantes vias envolvidas no processo da apoptose: via intrínseca e extrínseca da apoptose.

As duas vias apoptóticas podem ocorrer individualmente ou em simultâneo. A via extrínseca é mediada por estímulos exteriores que, através de ligandos como TRAIL, TNF ou FasL, ativam recetores de morte conhecido como DR4/DR5, TNFR e Fas, respetivamente (113, 132). A via intrínseca tem início na mitocôndria através de um estímulo pró-apoptótico, tais como danos no DNA (108), que originam a libertação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma (113).

Em ambas as vias existem enzimas essenciais ao processo da apoptose como é o caso das caspases (*cysteine aspartic acid specific proteases*) (133). Estas são um grupo de proteases com um resíduo de cisteína (133) que originam uma cascata de eventos designada de cascata das caspases (134). Estas podem dividir-se em dois tipos: caspases iniciadoras e caspases efetoras. As caspases iniciadoras clivam pro-formas inativas. Já as caspases efetoras clivam outros substratos proteicos das células resultando no processo apoptótico. São várias as caspases envolvidas nas vias apoptóticas nomeadamente:

- caspase 2, 8, 9 e 10 que são denominadas como caspases iniciadores do processo apoptótico (135);

- caspase 3, 6 e 7 classificadas como caspases efetoras (135);

Ao longo dos tempos têm vindo a ser encontradas novas caspases descritas como:

- caspase 1, 4 e 5 denominadas por caspases inflamatórias (135);
- caspase 11, identificada como reguladora da apoptose e da maturação de citocinas durante um choque séptico (135). Foi também detetada em outros mamíferos como roedores e a vaca *Bos taurus* (Linnaeus, 1758), e também é categorizada como caspase inflamatória (136);
- Caspase 12 medeia a apoptose específica do retículo endoplasmático e a citotoxicidade da β -amiloide (135). São também consideradas como caspases inflamatórias (136);
- Caspase 13 é homóloga da caspase 4 (137) e é também classificada como caspase inflamatória (136);
- Caspase 14 é altamente expressa em tecidos embrionário e não nos tecidos adultos (135).

Há evidências de que as duas vias estão interligadas e que as caspases de uma via podem interferir com as da outra (138). Em ambas as vias é comum a ativação da caspase-3, desempenhando um papel central na execução da apoptose, uma vez que constitui um forte alvo para a regulação da morte celular por apoptose (139). As caspases efetoras vão assim clivar uma variedade de proteínas essenciais à sobrevivência das células tais como as proteínas do citoesqueleto e de reparação do DNA, resultando assim na morte das células (108).

Via intrínseca da apoptose

A via intrínseca é assim designada uma vez que é iniciada dentro da célula e com o envolvimento da mitocôndria (108). É ativada por diferentes condições de stress, como por exemplo danos no DNA, hipoxia, carência de nutrientes essenciais ao crescimento, radiação, entre outros, que levam a alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna (114). Estas alterações levam a modificações na permeabilização da membrana mitocondrial externa, perda do potencial de membrana, paragem de síntese de ATP e à libertação de proteínas pro-apoptóticas.

A morte celular é realizada pela cascata de caspases, desencadeada pela libertação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma (Figura 9) (106). Esta libertação pode ser favorecida pela formação de poros mitocondriais.

Uma vez no citoplasma, o citocromo c desencadeia a produção de uma série de fatores formando o factor-1 apoptótico ativador da peptidase (APAF-1) e a pro-caspase 9 designado de apoptossoma (140) que subsequentemente leva à ativação da caspase-3, caspase-6 e/ou caspase-7 (141).

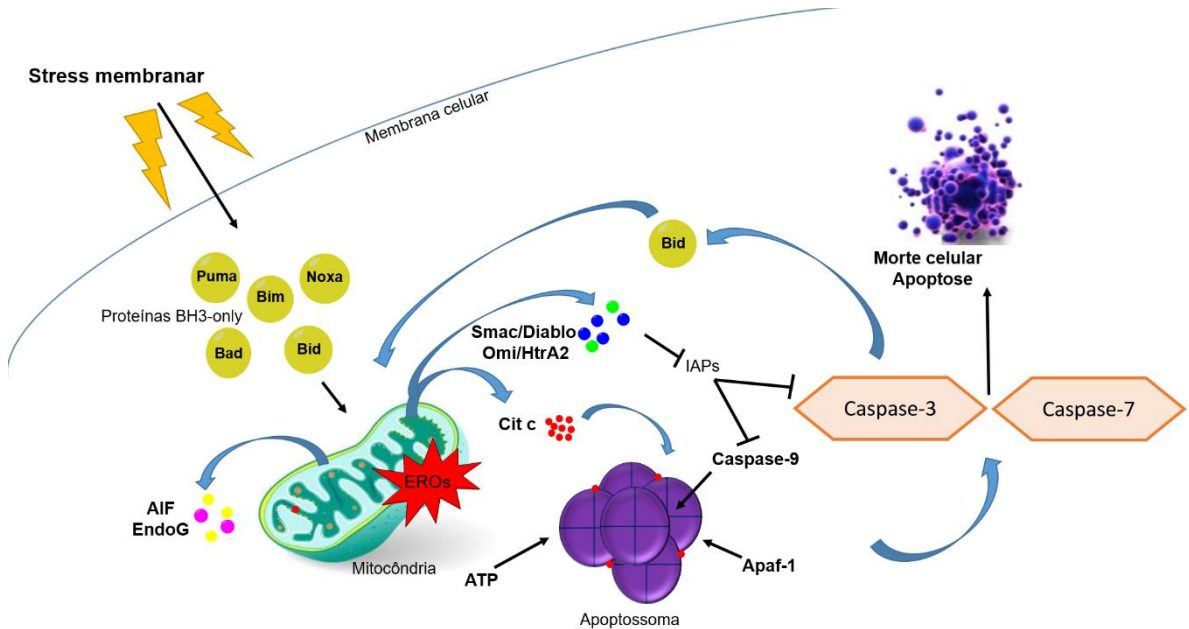


Figura 9 – Esquema representativo da via intrínseca da morte celular por apoptose.

Regra geral, determinados fármacos que desencadeiam esta via, causam perturbações e/ou permeabilização da membrana mitocondrial, levando à libertação de moléculas pró-apoptóticas que podem ser divididas em dois grandes grupos: um grupo que induz a apoptose numa via dependente de caspases no qual estão incluídas proteínas mitocondriais (142) como o citocromo c, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi; e outro grupo que induz a apoptose numa via independente das caspases, no qual estão incluídas a endonuclease G (EndoG) e fator indutor da apoptose (AIF) (2). Estas duas últimas proteínas após serem libertadas pela mitocôndria sofrem translocação para o núcleo originando a fragmentação do DNA.

Estas moléculas pró-apoptóticas são assim encontradas predominantemente no citoplasma ou ligadas à membrana mitocondrial externa como monómeros, enquanto que as proteínas com atividade anti-apoptótica são principalmente encontradas dentro da membrana mitocondrial externa ou no retículo endoplasmático (2).

A proteína Smac/DIABLO liga-se a inibidores endógenos da apoptose designados por inibidores de proteínas da apoptose (IAPs) (108). Todos estes inibidores possuem um domínio comum de 70 repetições de aminoácidos de baculovírus (143) que suprime a

função das caspases pela interação proteína-proteína, permitindo que os IAPs se liguem diretamente às caspases, inibindo assim a morte celular inapropriada (144).

Via extrínseca da apoptose

Como anteriormente referido, a via extrínseca da apoptose é mediada por recetores de morte pertencentes à família do TNF, que incluem recetores funcionais e de armadilha (ou decoy) 1 e 2 (DcR 1 e 2). Estes recetores contêm um domínio extracelular e um domínio intracelular citoplasmático (também conhecido como domínio de morte). O domínio intracelular citoplasmático é responsável pela transmissão do sinal de morte, levando à ativação dos recetores de morte que recrutam a molécula Fas-proteína associada com domínio de morte (FADD) e a pro-caspase-8, provocando modificações conformacionais que levam à formação de um complexo de sinalização de indução de morte designados por DISC (do inglês *death-inducing signaling complex*) (Figura 10) (108).

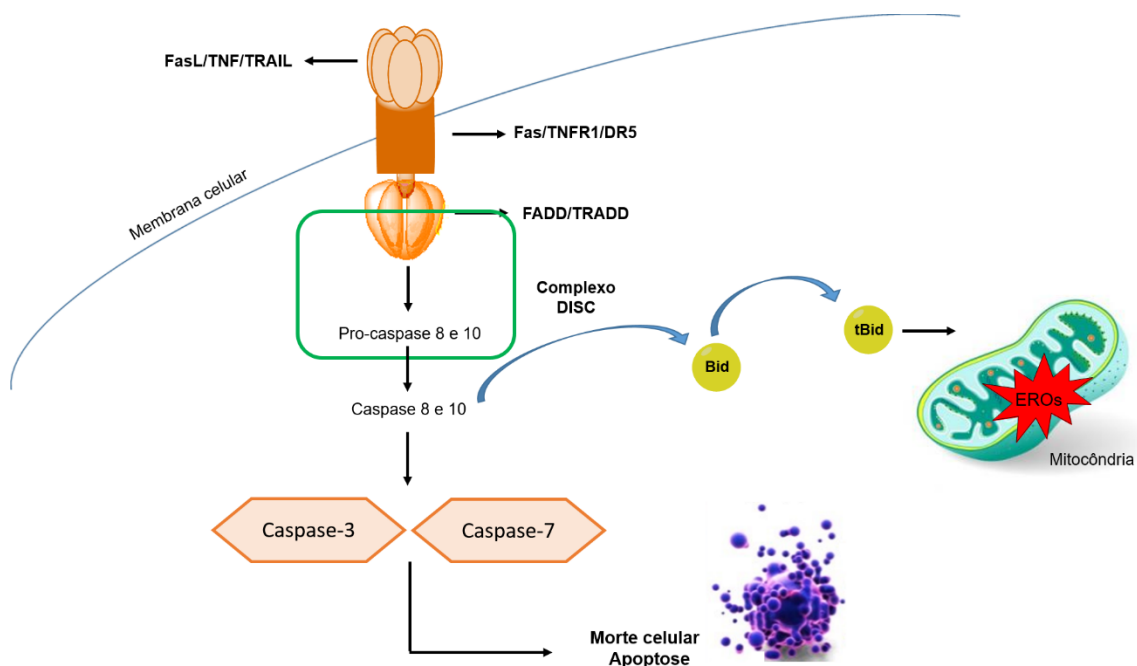


Figura 10 – Esquema representativo da via extrínseca da morte celular por apoptose.

Por sua vez, o complexo DISC ativa a caspase iniciadora pró-caspase 8 que, uma vez na sua forma ativa, pode ativar outras caspases efetoras através de duas vias (2, 145). Por um lado, em determinadas células a atividade da caspase-8 pode ser suficiente para conseguir ativar as caspases efetoras 3, 6 e/ou 7 que de seguida desencadeiam a resposta apoptótica, sendo esta via considerada dependente de caspases e independente da via mitocondrial. Por outro lado, em outras células a caspase-8 cliva a proteína Bid no fragmento Bid truncado (tBid) que sofre translocação para a mitocôndria, induzindo a

libertação do citocromo c (2). Por sua vez, esta via é considerada dependente da via mitocondrial. Após a libertação do citocromo c, este liga-se ao Apaf-1 e à caspase iniciadora pro-caspase 9 ativando-se assim a via intrínseca, na qual se forma o apoptossoma. De seguida o processo apoptótico é desencadeado pela ativação das caspases efetoras 3, 6 e/ou 7.

1.3.2. Inflamação

A inflamação é caracterizada como sendo uma resposta fisiológica dada pelo organismo de forma a conseguir eliminar, neutralizar e/ou destruir um agente agressor que cause infeção ou danos nos tecidos (6, 146). Constitui uma das primeiras linhas de defesa contra uma série de estímulos considerados prejudiciais (147). Os agentes agressores tanto podem ser produtos da degradação bacteriana (como lipopolissacarídeos e peptidoglicano), fungos, vírus ou mesmo danos nas próprias células do corpo que podem acabar por morrer (27). É caracterizada pelo aparecimento de edema, dor, vermelhidão e sensação de calor (27, 148), como resultado de uma série de ocorrências como a vasodilatação, aumentando o aporte sanguíneo ao local afetado, elevando assim a temperatura, provocando vermelhidão, aumento da permeabilidade vascular seguindo-se uma estagnação e trombose, infiltração de leucócitos no tecido, extravasamento do plasma sanguíneo, atividade proteolítica, formação de EROs e espécies reativas de azoto, apoptose e fagocitose (6).

A resposta inflamatória envolve várias vias de sinalização, sendo iniciada por indutores exógenos e/ou endógenos que levam à ativação de sensores especializados na produção de mediadores específicos (6). Adicionalmente, levam também à modificação do estado funcional de tecidos e órgãos permitindo a adaptação às condições inflamatórias (149). A resposta inflamatória começa com o reconhecimento de um sinal de inflamação, levando à libertação de mediadores pro-inflamatórios como aminas, interleucina-1 (IL-1), prostaglandinas, enzimas e leucotrienos (27). O risco de inflamação pode ser minimizado por alterações na dieta e nos principais fatores de risco (150).

Os macrófagos desempenham uma importante função na iniciação, manutenção e resolução da inflamação sendo ativados e desativados nos processos inflamatórios (151). Em condições patológicas, os macrófagos podem aumentar tanto a sua produção do $\cdot\text{NO}$ como do radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), resultando na formação do peroxinitrito (ONOO^-), um potente oxidante celular (152, 153). Além disto, quando ativados os macrófagos produzem citocinas pro-inflamatórias como as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6

respetivamente), $\text{TNF-}\alpha$ e outros mediadores inflamatórios como as prostaglandinas E_2 (PGE_2) (6, 154, 155). As proteínas quinases ativadas por mitogêneos (do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*) (MAPK) são reguladores críticos de citocinas pro-inflamatórias como o $\text{TNF-}\alpha$, as IL-6 e as IL-1 β , durante a inflamação (156). Dentro das MAPKs, a classe do p38 tem tido uma importância central na descoberta de novos fármacos anti-inflamatórias devido à sua importância na produção de citocinas pro-inflamatórias e outros mediadores (155). Um excesso de produção de mediadores inflamatórios está envolvido no aparecimento de algumas doenças como a artrite reumatoide, aterosclerose, asma e fibrose pulmonar (Figura 11) (6).

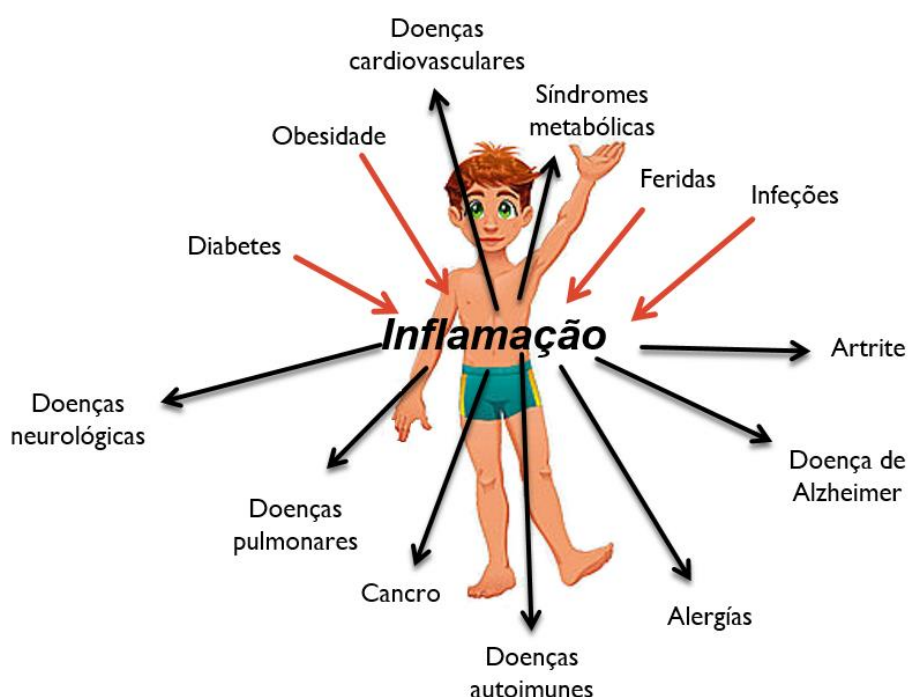


Figura 11 -Variedade de distúrbios que levam à inflamação e principais doenças que advém da inflamação.

Vários fatores são conhecidos por modularem os processos inflamatórios, sendo que o $\text{NF-}\kappa\text{B}$ desempenha um papel central (157)

O AA armazenado nas membranas celulares é convertido em AA livre pela ação da fosfolípase A_2 (PLA_2) levando à produção de uma série de mediadores pro-inflamatórios envolvidos na modulação da intensidade e duração da resposta inflamatória (Figura 12) (158). Quando é libertado das membranas fosfolipídicas, o AA pode ser metabolizado através de duas vias distintas nas quais estão envolvidas 2 grandes famílias de enzimas: lipoxigenase-5 (LOX-5) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) que levam à produção de leucotrienos e prostaglandinas e tromboxanos, respetivamente, que possuem diferentes ações inflamatórias. A enzima COX é dos principais alvos terapêuticos dos anti-inflamatórios não

esteroides. O AA e os ácidos gordos polinsaturados ômega-6 podem assim ser considerados como ácidos gordos pró-inflamatórios, uma vez que são os precursores de eicosanóides, levando ao aumento da resposta inflamatória (6). A ingestão dos ácidos gordos polinsaturados ômega-3 EPA e DHA leva a uma diminuição na produção de mediadores inflamatórios (tais como eicosanoides, citocinas e NO que inibem a expressão da síntese do óxido nítrico indutível (iNOS)) uma vez que estes competem com o AA para a enzima COX-2 (em ambos os casos) e LOX-5 (no caso do EPA) (6, 159-162). Assim, é importante estabelecer um equilíbrio no consumo de animais marinhos ricos em ômega-3 tais como EPA e DHA (163).

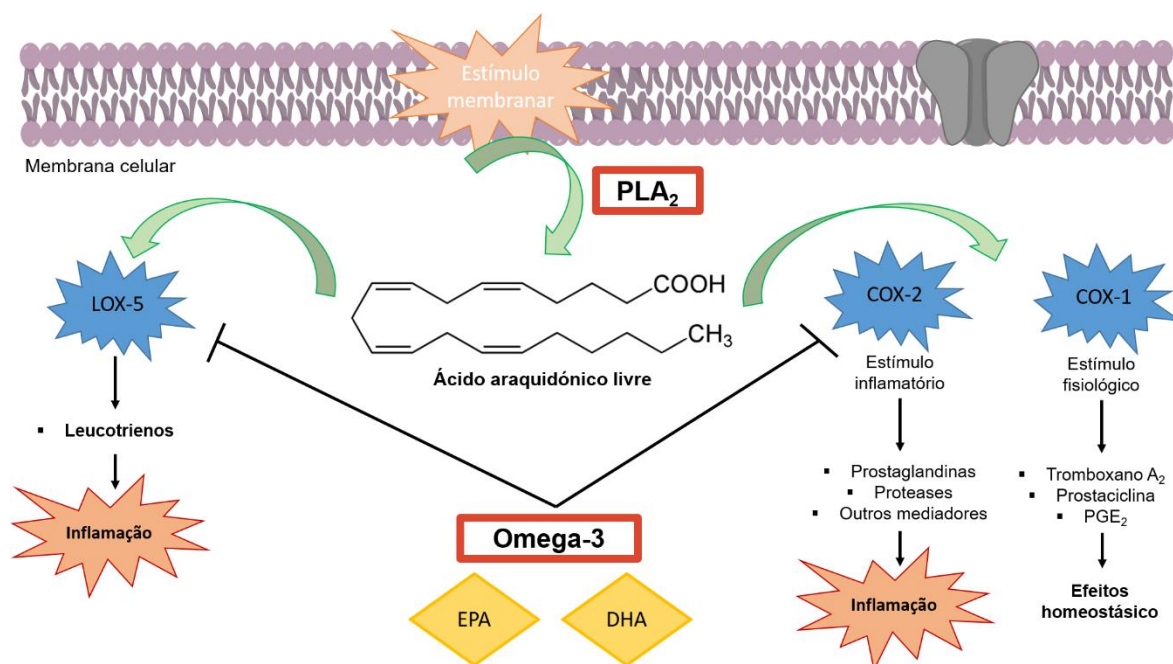


Figura 12 – Mecanismo de produção de mediadores pro-inflamatórios pela liberação do AA das membranas, através das duas principais vias que o envolvem, com a respetiva ação benéfica dos ácidos gordos ômega-3.

O aumento da incidência de doenças inflamatórias está também associado com a produção excessiva de eicosanoides que tanto são derivados da ingestão de ômega-6 como ômega-3 (55).

Vários estudos têm fornecido várias evidências de que cada vez mais os produtos naturais de diversas fontes, têm revelado uma enorme importância para o desenvolvimento de novos fármacos para o uso eficaz na terapêutica de doenças inflamatórias (6, 27, 147). Tem sido reportada atividade anti-inflamatória de compostos de origem marinha de organismos pertencentes ao Filo Cnidaria, inclusive pela inibição da PLA₂ (164-167). Além disto, vários carotenoides como a zeaxantina, fucoxantina, luteína e o β -caroteno têm vindo a demonstrar uma grande capacidade anti-inflamatória, isto porque o carotenoide

zeaxantina, é conhecido como um inibidor da expressão da iNOS (168). Já a fucoxantina está relacionada com a capacidade para inibir a produção do $\cdot\text{NO}$, expressão da iNOS, COX-2 e citocinas pro-inflamatórias (169). A luteína e o β -caroteno inibem a produção do $\cdot\text{NO}$ pela diminuição da expressão da iNOS (6).

Capítulo 2

2. Objetivos

O presente trabalho expõe uma investigação sistemática da interação de extratos aquosos de *A. equina* e *A. sulcata* em células AGS e RAW 264.7 com o objetivo de caracterizar a sua atividade biológica, encarando esta sob duas perspetivas: toxicológica e farmacológica. Para tal o trabalho focou-se especificamente nos seguintes objetivos:

- ✓ Caracterizar a composição química dos extratos aquosos;
- ✓ Avaliar os efeitos citotóxicos causados pelos extratos em células AGS e RAW 264.7;
- ✓ Avaliar o envolvimento das caspases na morte celular causada pelos extratos nas duas linhas celulares;
- ✓ Avaliar a diminuição da produção de EROs causada pelos extratos em células RAW 264.7 expostas ao lipopolissacarídeo (LPS);
- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos num modelo celular (RAW 264.7) e num modelo não-celular (inibição da via do AA);
- ✓ Avaliar os efeitos causados pelo composto identificado em ambos os extratos de forma a tentar correlacionar-se as atividades dos extratos com o respetivo perfil cromatográfico;

Capítulo 3

3. Materiais e métodos

3.1. Substâncias de referência

LPS de *Salmonella enterica*, sulfanilamida, diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCDHF-DA), brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), meio de montagem DPX, piruvato de sódio, dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH), Triton™ X-100, Corante de Giemsa, N-dicloridrato de (1-naftil)-etilenodiamina, deoxicolato de sódio, cloridrato de Trizma®, dimetilsulfóxido (DMSO), lipoxigenase de soja proveniente de from *Glycine max* (L.) Merr. (Type V-S; EC 1.13.11.12), PLA₂ de veneno de abelha (*Apis mellifera*), azul de tripano, 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina, iodometano, carbonato de propileno, ácido picolínico e propano-2-ol foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Meio Eagle modificado de Dulbecco's (DMEM), soro fetal de bovino (FBS), solução salina equilibrada de Hank's, tripina- ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (1x) 0.05 %, solução de penicilina-streptomicina (penicilina 5000 unidades/mL e streptomicina 5000 µg/mL) foram obtidos da GIBCO, Invitrogen™ (Grand Island, NY, USA). Kit caspase 3/7 para ensaio de luminescência foi obtido da Promega Corporation. A estaurosporina e o carbobenzoil-valil-alanil-aspartil- [O-metil] -fluorometilcetona (Z-VAD.fmk) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology, Inc. Acetonitrilo (CH₃CN), dihidrogenofosfato de potássio e o metanol foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido clorídrico (HCl) foi obtido da VWR Internacional, LLC (Radnor, Pensilvânia, EUA). O amoníaco e o eter etílico foram obtidos da Panreac. O ácido fosfórico (H₃PO₄) foi obtido da Scharlau.

3.2. Síntese da Homarina

Uma vez que o composto puro homarina não se encontrava disponível comercialmente a tempo útil da realização do trabalho, decidiu-se proceder à sua síntese. Para tal, 1,5 g de iodometano foram adicionados a uma suspensão bem dissolvida de ácido picolínico (0,81 mmol) em um volume final de 20 mL de carbonato de propileno. O

preparado ficou durante 2 dias em repouso e de seguida adicionou-se 100 mL de éter levando à formação de um precipitado amarelado. Este sólido foi recristalizado em metanol/éter. A identidade da molécula foi confirmada por ^1H -RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm: 4,55 (3H, s), 8,11 (1H, td, $J = 7$ Hz, $J = 1$ Hz), 8,36 (1H, dd, $J = 8$ Hz, $J = 1$ Hz), 8,65 (1H, td, $J = 8$ Hz, $J = 1$ Hz), 8,96 (1H, dd, $J = 7$ Hz, $J = 1$ Hz); ^{13}C -RMN (101 MHz, MeOD) δ ppm: 49,00, 129,53, 129,59, 147,69, 148,58, 150,78, 163,73. O espectro de RMN encontra-se disponível na seção dos anexos (Figura 38).

3.3. Recolha das amostras e preparação dos extratos

Para a realização dos estudos descritos ao longo deste trabalho, foram recolhidas amostras de 2 espécies de anémonas-do-mar distintas: *A. sulcata* e *A. equina*. Ambas as espécies foram recolhidas na Praia da Luz, Porto, Portugal em julho de 2014. Após recolha, as amostras foram colocadas em gelo e imediatamente transportadas para o laboratório no qual se seguiu uma lavagem com uma solução salina de forma a remover os contaminantes. De seguida as amostras foram congeladas e liofilizadas (liofilizador Lacone Freezone 4.5 – Cidade de Kansas, MO, EUA).

Para a realização de ambos os extratos, as amostras de anémonas-do-mar liofilizadas foram pulverizadas e de seguida pesaram-se 5 g de amostra previamente tamisadas (910 μm). Após este procedimento 100 mL de água ou etanol (extrato aquoso e etanólico respetivamente) foram adicionados. O preparado ficou durante 30 min em agitação (200 rpm), à temperatura ambiente. Posteriormente ambos os extratos foram centrifugados (ROTOFIX 32A, Hettich, Tuttlingen, Germany) a 40 rpm durante 10 min e de seguida foram filtrados a pressão reduzida.

O extrato aquoso de cada espécie foi congelado a -20°C e liofilizado durante 7 dias, sendo depois armazenado no exsiccador ao abrigo da luz até posterior análise. O extrato etanólico foi evaporado (BUCHI Labortechnik AG Rotavapor, Switzerland) até secura completa e armazenado ao abrigo da luz a -20°C até uma posterior análise.

3.4. Caracterização química dos extratos

3.4.1. Pesquisa de alcaloides

De forma a detetar-se a presença de alcaloides no extrato, foi realizada uma extração, purificação e identificação de alcaloides recorrendo aos reagentes gerais de

alcaloides: Dragendorff, Mayer e Bertrand que possuem composições diferentes de forma a ser possível a pesquisa de diversos alcaloides presentes no extrato.

O reagente de Dragendorff (iodeto de bismuto e potássio – precipitado vermelho tijolo) e o reagente de Mayer (tetra-iodomercurato de potássio – precipitado amarelo) são reagentes iodados que precipitam os alcaloides das soluções aquosas ácidas, sob a forma de poli-iodetos complexos, enquanto o reagente de Bertrand (ácido sílico-túngstico – precipitado branco) é um políácido mineral complexo que precipita os alcaloides em meio ácido ou neutro.

Primeiramente é realizado um ensaio preliminar, recorrendo a uma extração geral em meio aquoso ácido. Caso algum dos resultados seja positivo, segue-se com o chamado “ensaio decisivo” uma vez que este sinal positivo pode significar a presença não só de alcaloides como também de proteínas e glicosídeos, entre outros. Assim neste ensaio além da extração em meio aquoso ácido prossegue-se com uma purificação do extrato.

A extração dos alcaloides é então feita por um método misto, em que a amostra em pó é aquecida com uma solução ácida diluída, obtendo-se os alcaloides na forma de sal. O meio é depois alcalinizado e os alcaloides extraídos com um solvente orgânico (éter). A solução etérea é depois agitada com uma solução de ácido clorídrico diluído, a qual é depois separada e dividida por tubos aos quais se adicionam os reagentes gerais dos alcaloides.

Inicialmente pesou-se 1 g de extrato de anémona-do-mar sendo este aquecido em 10 mL de solução de HCL a 10% para que os compostos fiquem na forma de sais. De seguida o preparado foi arrefecido e filtrado com o auxílio de uma ampola de decantação. Ao filtrado juntou-se solução de amónia diluída (1:1) de forma a alcalinizar a solução e agitou-se com 20 mL de éter etílico para os compostos voltarem à sua forma livre (ter em atenção a libertação de gases). Após repouso separou-se a fase etérea, adicionaram-se 10 mL de solução de HCL 10% de forma aos compostos voltarem novamente à forma de sais e agitou-se bem.

A solução foi dividida por 4 tubos de ensaio:

- Tubo 1 – serviu como controlo;
- Tubo 2 – juntou-se 3 gotas de reagente de Dragendorff;
- Tubo 3 – juntou-se 3 gotas de reagente de Mayer;
- Tubo 4 – juntou-se 3 gotas de reagente de Bertrand;

3.4.2. Análise de compostos por cromatografia líquida de elevada pressão com detecção por díodos (HPLC-DAD)

A análise cromatográfica dos compostos presentes nos extratos aquosos de *A. equina* e *A. sulcata*, foi obtida usando um sistema de HPLC-DAD utilizando uma coluna de fase reversa (Waters Spherisorb®, C18, 5 µm ODS2, 250 x 4,6 mm Analytical Cartridge, Part NO. PSS839540, Ireland) à temperatura ambiente e usando um método de eluição por gradiente. A fase móvel consistiu na combinação de dois solventes: água (H₂O) e CH₃CN. O gradiente usado encontra-se representado pela Tabela 7.

A pesquisa do composto homarina em ambas as matrizes em estudo foi realizada a partir dos extratos aquosos liofilizados e redissolvidos no mesmo solvente extrator. A concentração final obtida para a injeção no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com díodos (HPLC-DAD) foi de 50 mg/mL para a espécie *A. sulcata* e de 25 mg/mL para a espécie *A. equina*. Ainda antes da injeção, os extratos foram filtrados através de filtros de Nylon com um tamanho de poro de 0,45 µm. De seguida foram injetados 20 µL do filtrado no sistema de HPLC-DAD. Os dados espectrais de todos os picos identificados foram recolhidos numa gama entre 200 a 400nm, contudo a eluição dos compostos foi monitorizada apenas a 280, 320 e 350 nm e os dados foram processados utilizando o *software* Clarity (Europa Science Ltd, Cambridge, Reino Unido).

Tabela 7 – Sistema em gradiente utilizado para a análise do composto homarina em ambos os extratos aquosos por HPLC-DAD.

Tempo (min)	H ₂ O (%)	CH ₃ CN (%)	Fluxo (mL/min)
0	0	100	0,9
5	0	100	
15	15	85	
25	30	70	
35	70	30	

A identificação do composto foi realizada através da comparação do tempo de retenção e do máximo de absorção do espectro UV-Vis dos extratos com o respetivo pico do composto puro analisado nas mesmas condições.

Relativamente à quantificação do composto nos extratos, esta foi realizada a partir da interpolação das áreas registadas nos cromatogramas dos extratos na reta de

calibração do composto puro em concentrações de 12,5, 50, 250, 500 e 2500 μM , nas mesmas condições experimentais.

3.5. Atividade enzimática:

3.5.1. PLA₂ do veneno de abelha

A PLA₂ (EC.3.1.1.4) proveniente do veneno de abelha (*Apis mellifera*) foi solubilizada em água na concentração de 1 mg/mL, sendo posteriormente diluída em tampão A (desoxicolato de sódio 3 mM dissolvido em tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,5) de forma a usar-se a concentração final de 0,25 $\mu\text{g/mL}$. O substrato da PLA₂ usado foi o 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina na qual foram preparadas alíquotas em clorofórmio (12,5 mg/mL) posteriormente secas em azoto. A concentração final usada foi de 65 μM dissolvido em tampão B (desoxicolato de sódio 10 mM dissolvido em tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,5). A enzima 5-LOX de soja (*Glycine max*) foi usada na concentração final de 0,23 $\mu\text{g/mL}$ dissolvida em tampão A. Tanto os extratos aquosos como a homarina foram dissolvidos em tampão A. O ensaio realizou-se com um volume final de 140 μL no qual foram adicionados 50 μL de amostra, 20 μL de cada uma das enzimas e de substrato, sendo o restante volume completo com tampão A. Para ambas as amostras foram realizados os respetivos brancos de forma a ser possível eliminar possíveis interferências de absorção por parte dos extratos e da homarina. Após adição do substrato e consequente início da reação, procedeu-se a uma incubação de 25 min à temperatura de 37°C. As respetivas atividades foram determinadas a 234 nm usando um leitor de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO.

3.6. Cultura celular

Para a realização dos estudos *in vitro* foi utilizada uma linha celular humana de carcinoma gástrico AGS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e uma linha de macrófagos RAW 264.7 (American Type Culture Collection, LGC Standards S.L.U., Barcelona, Spain).

Ambas as linhas celulares foram cultivadas num meio GIBCO® DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + GlutaMAX™ (suplemento de glutamina) (life Technologies, Paisly, Reino Unido) enriquecido com 10% (v/v) de soro bovino fetal inativado e 1% (v/v) de antibiótico (penicilina/estreptomicina) e incubadas a 37°C na presença de 5% (v/v) de CO₂ e com uma atmosfera humidificada e controlada.

Inicialmente as células armazenadas a -80°C , foram descongeladas no meio referido anteriormente e centrifugadas a 1300 rpm durante 3 min à temperatura ambiente de forma a remover o agente crioprotetor, DMSO, que exerce toxicidade sobre as células. De seguida o sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* foi ressuspenso em 6 mL de meio de crescimento.

Após o crescimento controlado e pretendido das células AGS procedeu-se à tripsinização, uma vez que este tipo de células é mantido em aderência ao suporte de crescimento. Primeiramente o meio foi removido, as células lavadas com a solução salina GIBCO® HBSS (solução salina tamponada de Hank's) (life Technologies, Paisly, Reino Unido) e de seguida tripsinizadas com 2 mL de tripsina/EDTA 0,25%. As células tripsinizadas foram recolhidas com meio de cultura e centrifugadas (ThermoFisher Scientific, Osterode am Harz, Alemanha) a 1300 rpm durante 3 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* ressuspenso em 4 mL de meio.

Relativamente aos macrófagos, as células foram lavadas com HBSS e de seguida adicionaram-se 10 mL de meio. Seguiu-se com a raspagem.

A partir das suspensões celulares obtidas, procedeu-se a uma diluição na proporção de 1:20 com uma solução de azul tripano 0,4% (v/v) e aguardou-se aproximadamente 1 minuto de forma ao corante penetrar nas células com a membrana fragilizada. De seguida colocou-se uma gota da suspensão celular na câmara de Neubauer (Figura 13) e procedeu-se à contagem de células viáveis (células não coradas uma vez que não possuem a membrana citoplasmática danificada), num microscópio ótico.

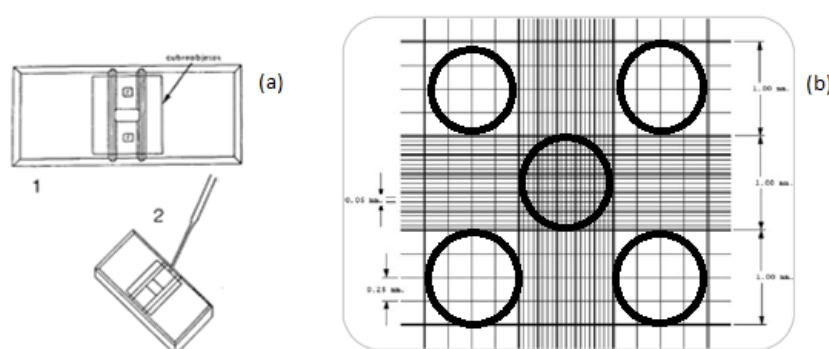


Figura 13 - Esquema representativo da montagem de um hemocitómetro (a) e da imagem observada ao microscópio do mesmo (b). Os círculos observados na imagem (b) são representativos dos quadrantes usados para a contagem das células viáveis. Adaptado de (170).

Após a contagem as células foram semeadas em placas com uma densidade de células apropriada à realização dos diversos ensaios *in vitro*.

3.6.1. Determinação da viabilidade celular: MTT

Este é um método colorimétrico, rápido e o mais frequentemente usado para avaliação da viabilidade celular e do impacto de compostos ou extratos em diversas concentrações (171, 172). Este método inicialmente sugerido por Mosmann (1983), avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT (que apresenta cor amarela em solução) acumulado pelas células por endocitose (173). Por isso mesmo é ainda considerado como uma medida da viabilidade das células, uma vez que a endocitose e a atividade mitocondrial são características fundamentais da maioria das células vivas (172).

Este método resulta na produção de cristais de formazano (que apresentam cor violeta) (Figura 14), no interior das células que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose, sendo este um mecanismo fundamental das células vivas (172). Esta redução do formazano ocorre principalmente na mitocôndria devido à ação do complexo II da cadeia transportadora de elétrons (174) por uma enzima mitocondrial designada por succinato-desidrogenase. A estrutura central do MTT com os grupos de azoto, são assim clivados por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH ocorrendo assim a formação dos cristais de formazano que podem ser solubilizados com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO que apresenta capacidade de penetrar nas membranas biológicas (175). Após solubilização dos cristais pode ser feita a sua quantificação por espectrofotometria UV-Vis (171, 172, 176, 177). Além disso são ainda possíveis de ser observados ao microscópio.

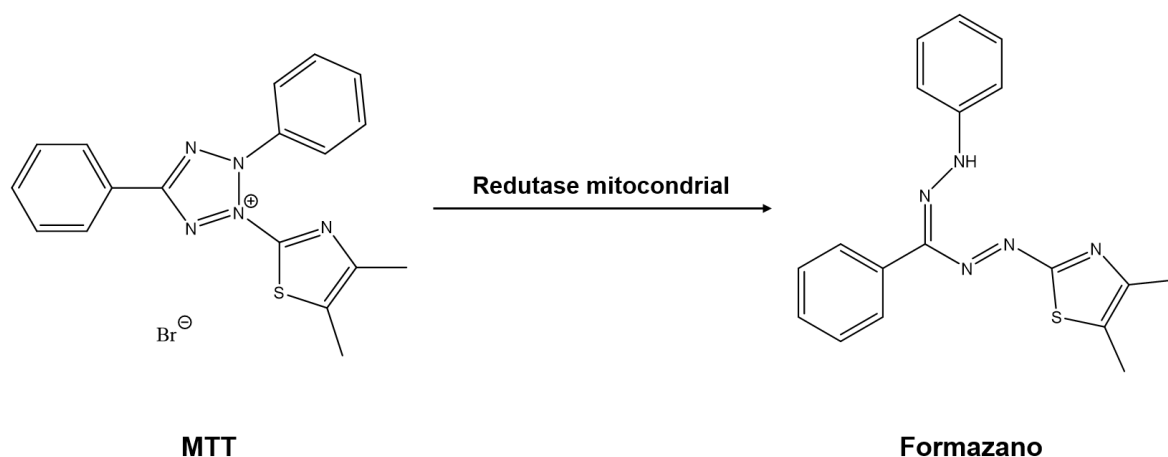


Figura 14 – Redução do MTT a cristais de formazano.

As células (AGS e RAW 264.7) foram cultivadas em placas para cultura celular de 96 poços (com uma densidade celular de 25000 células/poço para as RAW 264.7 e 15000

células/poço para as AGS) no meio de crescimento. Após 24 h de incubação foram adicionados os extratos e o composto puro nas diversas concentrações. Para as células RAW 264.7 a incubação foi também realizada na presença de LPS (1 µg/mL), adicionado 2 h após a adição de extratos. Depois de 24 h de incubação, 100 µL de MTT dissolvido em meio (0,5 mg/ml) foram adicionados à placa de 96 poços. Após 90 min os cristais de formazano foram solubilizados com uma mistura de DMSO:isopropanol (3:1) e bem homogeneizados, procedendo-se depois à leitura da absorvência no leitor de placas Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation) a 570 nm. Os dados foram processados utilizando o *software* Ascent, versão 2.6.

A percentagem de células viáveis foi depois determinada através da comparação de valores de absorvência das células expostas ao extrato com os respetivos valores da absorvência das células não expostas (controlos), obtida pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Média da absorvência das células tratadas com extrato}}{\text{Média da absorvência das células não tratadas}} \times 100$$

3.6.2. Avaliação da integridade membranar

As células foram cultivadas em placas de 96-poços como previamente descrito no ensaio do MTT. A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima presente numa grande variedade de organismos e catalisa a conversão do piruvato a lactato com uma concomitante conversão do NADH a NAD⁺. Assim, após incubação, 20 µL de sobrenadante foram recolhidos sendo de seguida adicionados 25 µL de piruvato (1,363 Mm) e 230 µL de NADH (210,7 µM). Neste ensaio é importante existir uma maior quantidade de substrato do que enzima de forma a que toda a enzima seja consumida na reação. A reação foi doseada a 340 nm durante 3 min. O Triton X-100 a 1% foi adicionado durante 30 min de forma a lizar as células para ser usado como controlo positivo do ensaio.

3.6.3. Estudos morfológicos – coloração de Giemsa

Para avaliação morfológica as células AGS foram cultivadas em lamelas previamente colocadas em placas para cultura celular de 24 poços, com uma densidade celular de 50000 células/poço e no meio de crescimento já descrito anteriormente. Após 24 h de incubação as células foram lavadas com HBSS e de seguida foram adicionados os extratos e o composto puro nas concentrações anteriormente definidas como sendo tóxicas neste

tipo de células: 1 mg/mL do composto puro homarina, 0,25, 0,5 e 1 mg/ml de extrato aquoso de *A. equina* e 0,5 e 1 mg/mL de extrato aquoso de *A. sulcata*. Após 24 h de incubações dos extratos procedeu-se à coloração de Giemsa. As lamelas foram lavadas com HBSS e de seguida fixadas com metanol previamente arrefecido (4°C) durante 30 min. De seguida as lamelas foram novamente lavadas com HBSS. Seguiu-se com a adição do corante de Giemsa diluído (1:10) e previamente filtrado com filtros de nylon com o tamanho de poro de 0,45 µm, durante 25 min. Após este processo as lamelas foram repetidamente lavadas com água destilada e depois fixadas em lâminas com meio de montagem DPX.

3.6.4. Atividade das caspases

As células foram cultivadas em placas brancas de 96 poços com uma densidade celular de 25000 células/poço para as células RAW 264.7 e 15000 células/poço para as células AGS. Após adesão as células foram tratadas com os extratos aquosos e a homarina durante 8 h. Após esta incubação 70 µL de sobrenadante foram retirados ficando na placa um total de 40 µL de sobrenadante e 40 µL de uma mistura de tampão e substrato do kit Caspase-Glo® foram adicionados à placa e incubados durante 30 min. Isto permitiu às células lisarem, seguindo-se a clivagem do substrato da caspase-3/7 de forma a criar um sinal luminescente produzido pela luciferase. As células expostas a estaurosporina (500 nM) foram usadas como controlo positivo.

3.6.5. Espécies reativas de oxigénio

Para avaliar a produção de EROs intracelular as células RAW 264.7 foram cultivadas em placas pretas de 96 poços com uma densidade celular de 35000 células/poço. As células foram previamente incubadas com os extratos nas concentrações previamente descritas como não tóxicas e sem LDH positiva: 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 e 1 mg/mL do composto puro homarina e 0,0625, 0,125 e 0,25 mg/ml de extrato aquoso de *A. equina* e *A. sulcata*. Após 2 h de incubação as células foram expostas a 1 µg/mL de LPS durante 22 h.

Após a incubação com os extratos, as células foram lavadas com HBSS durante 30 min e após o fim da incubação foi adicionada uma solução de sonda DCDHF-DA (25 µM) durante 45 min. De seguida realizou-se a quantificação das EROs intracelular usando um leitor de placas Cytation 3 Imaging reader (Biotek) (excitação: 490 nm e emissão: 520 nm).

3.6.6. Determinação do óxido nítrico

As células RAW 264.7 foram cultivadas em placas para cultura celular de 96 poços (com uma densidade celular de 35000 células/poço) no meio de crescimento. Após 24 h de incubação foram adicionados os extratos e o composto puro nas concentrações não-tóxicas previamente determinadas. Após 2 h de incubação com os extratos e o composto puro, 2 µL de LPS (1 µg/mL) foram adicionados a cada poço. Após 22 h da adição do LPS foi realizada a reacção de Griess, no qual volumes iguais de 75 µL de sobrenadante de cultura e reagente de Griess [1:1 mistura de 1%, m/v de sulfanilamida e 0,1% m/v de dicloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina em 2% de ácido fosfórico] foram misturados numa placa de 96 poços. A reacção foi incubada por 10 min no escuro e à temperatura ambiente. De seguida a absorvência do cromóforo formado durante a diazotação do nitrito com a sulfanilamida seguido de um acoplamento com o dicloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina foi lida a 562 nm num leitor de placas Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation). Os dados foram processados utilizando o *software* Ascent, versão 2.6.

Os valores do controlo foram obtidos na ausência de extratos e do composto puro e após a adição do LPS e a % de NO foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de NO} = \frac{\text{Média da absorvência das células tratadas com extrato e LPS}}{\text{Média da absorvência das células não tratadas com extrato mas com LPS}} \times 100$$

3.7. Análise estatística

Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism (versão 6.01) e os resultados expressos pela média ± erro padrão da média. O teste *t*-Student foi usado para determinar diferença significativas entre células tratadas e células não tratadas. O nível de significância foi fixado com um valor de $p < 0,05$. Os resultados foram obtidos a partir de pelo menos 4 ensaios independentes no qual cada concentração foi usada em triplicados (tanto nos ensaios celulares como nos ensaios não-celulares).

Capítulo 4

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização química dos extratos

4.1.1. Pesquisa de alcaloides

Após a preparação dos extratos, procedeu-se com a realização de um ensaio *screening* para a deteção da presença de alcaloides nos extratos. Para tal realizou-se um ensaio que se baseou na solubilidade dos sais de alcaloides em soluções ácidas. Uma vez que este ensaio preliminar deu positivo, seguimos com o chamado “ensaio decisivo”, uma vez este resultado, pode ser devido não só à presença de alcaloides, mas também de outros constituintes de origem vegetal como proteínas, glicosídeos, taninos entre outros. Neste ensaio decisivo realizamos vários processos de purificação. A solução final foi dividida por 4 tubos de ensaio como observamos na Figura 15, de forma a testarmos em cada tubo os reagentes gerais dos alcaloides.

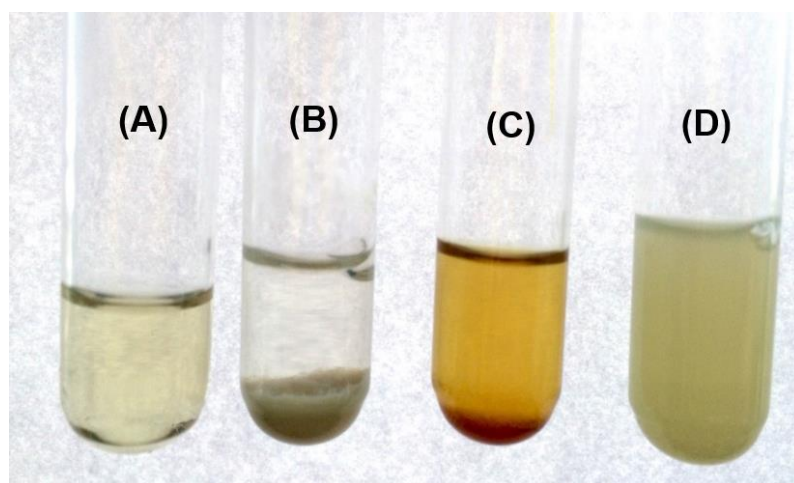


Figura 15 – Resultados obtidos do ensaio decisivo dos alcaloides para o extrato aquoso de *A. sulcata*. (A) controlo, (B) reagente de Bertrand, (C) reagente de Dragendorff e (D) reagente de Mayer.

Assim o tubo A serviu como controlo no qual não ocorreu qualquer tipo de precipitado. Ao todo B foram adicionadas 3 gotas do reagente de Bertrand ao qual se observou a formação de um precipitado branco. Ao tubo C foram adicionadas 3 gotas do reagente de Dragendorff ao qual se observou o aparecimento de um precipitado alaranjado. Por fim ao tubo D adicionou-se 3 gotas de reagente de Mayer e também neste se verificou a formação de um precipitado amarelado.

Concluimos assim que ambos os extratos contêm na sua composição alcaloides.

4.1.2. Identificação química de compostos por HPLC-DAD

O perfil cromatográfico das duas espécies de anêmonas-do-mar em estudo foi avaliado por HPLC-DAD resultando nos cromatogramas da (Figura 17). A análise por HPLC-DAD permitiu a identificação de 4 picos diferentes para o extrato aquoso de *A. sulcata* e 3 picos diferentes para o extrato aquoso de *A. equina* sendo que ambas as espécies possuem em comum o composto correspondente ao pico maioritário. Este composto possui um comprimento de onda máximo a 277,6 nm (Figura 16) e no gradiente usado um tempo de retenção de aproximadamente 22 min.

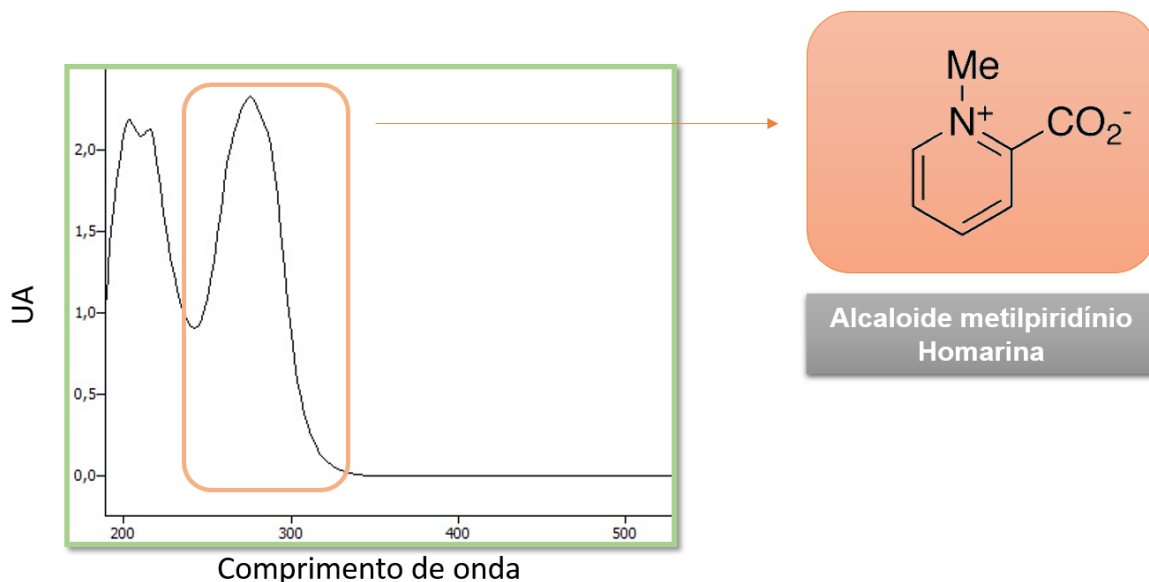


Figura 16 – Espectro UV-Vis do composto puro homarina obtido por HPLC-DAD com a respetiva estrutura química.

Após consulta da bibliografia e após resultado positivo do ensaio dos alcaloides, suspeitou-se da presença do alcaloide homarina, já reportado para a espécie *A. sulcata* capturada na região litoral da cidade de El Jadida (Marrocos) (26). Uma vez que este composto não estava disponível comercialmente, procedeu-se à sua síntese como descrito

na respetiva secção (página 47) e através da co-eluição do composto puro sintetizado com os extratos confirmou-se que o composto homarina estava presente em ambos os extratos e que correspondia ao pico maioritário em ambos como podemos observar pelos cromatogramas da Figura 17. O isómero trigonelina, frequentemente associado a organismos no qual a homarina também estava presente, também foi pesquisado através da co-eluição com o composto padrão e os extratos, contudo não foi encontrado em nenhuma das espécies estudadas contrariamente ao que já tinha sido descrito em 1953 por Ackermann e os seus colaboradores (178). Para além disto, foram injetados diferentes padrões correspondentes a diferentes classes de composto fenólicos derivados do ácido cinâmico e do ácido benzoico que existiam no laboratório, contudo nenhum correspondeu com os picos identificados em ambos os cromatogramas dos extratos aquosos. Contudo não se excluiu a hipótese da existência de outra classe de compostos fenólicos presentes no extrato.

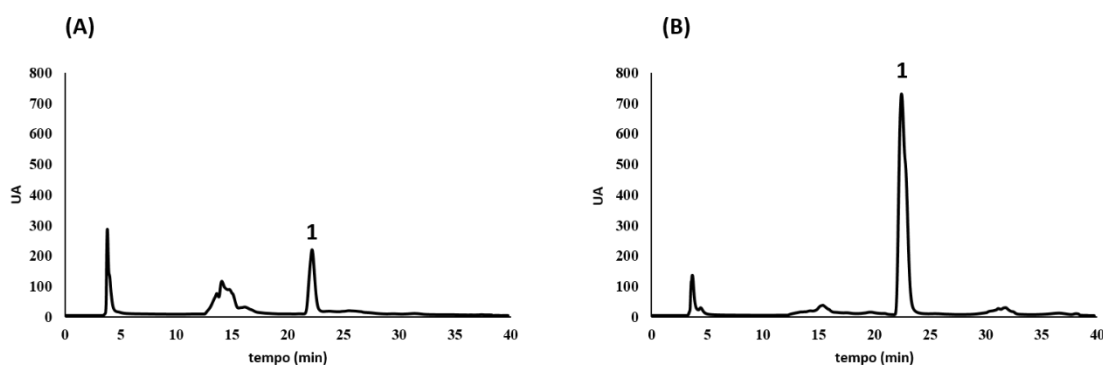


Figura 17 – Perfil cromatográfico dos extratos aquosos de *A. sulcata* (A) e *A. equina* (B) obtido pelo sistema de HPLC-DAD com deteção a 280 nm.

O extrato etanólico foi também injetado por HPLC-DAD, contudo apenas se identificou 1 único pico em ambos os cromatogramas, correspondentes ao composto puro homarina. A baixa concentração de extrato injetado (5 mg/mL) comparativamente aos extratos aquosos, pode justificar o facto de apenas se ter identificado um único pico uma vez que os compostos poderiam estar de tal forma diluídos que não foi possível a sua deteção. Assim, devido à semelhança entre o extrato aquoso e etanólico de ambas as espécies e de forma a mimetizarmos melhor o que acontece na alimentação humana, excluiu-se o extrato etanólico para a realização dos restantes ensaios.

4.1.3. Quantificação da homarina nos extratos

Após identificação do alcaloide homarina em ambos os extratos aquosos de anémonas-do-mar procedeu-se à quantificação do mesmo. Inicialmente realizou-se uma curva de calibração com diferentes concentrações de homarina (Figura 18) e de seguida procedeu-se com a interpolação para a obtenção da concentração em cada um dos extratos.

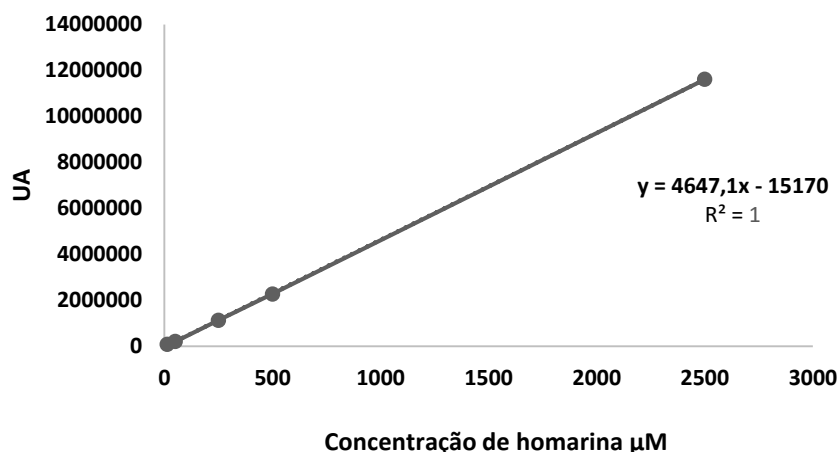


Figura 18 – Retas de calibração das áreas de pico obtidas por HPLC-DAD para cada concentração de homarina com a respetiva equação da reta e coeficiente de correlação.

Para o extrato aquoso de *A. sulcata* na concentração de 1 mg/mL obtivemos uma concentração de 5,67 μM enquanto para o extrato de *A. equina* na concentração de 1 mg/mL obtivemos uma concentração de 24,64 μM.

4.2. Efeitos Biológicos em células gástricas

4.2.1. Efeitos citotóxicos

Uma vez que a disfunção mitocondrial é um dos passos iniciais nas vias apoptóticas (179), o ensaio do MTT já descrito, foi realizado de forma a determinar a disfunção mitocondrial nas células AGS expostas aos extratos (Figura 19(A)) e ao composto puro homarina (Figura 19(B)). A avaliação da citotoxicidade provocada pelos extratos aquosos, foi avaliada ao fim de 24 h de incubação de forma a definir-se a gama de concentrações a utilizar.

Como podemos observar pelo gráfico da Figura 19(A) ambos os extratos apresentam citotoxicidade dependente da concentração para com as células AGS. Este efeito de citotoxicidade foi mais evidente partir da concentração de 0,250 mg/mL e para o extrato

aquoso de *A. equina* apresentando um IC₅₀ de 0,365 mg/mL. Para o extrato aquoso de *A. sulcata* não foi possível determinar o IC₅₀ nas concentrações usadas. Verificou-se assim que o extrato aquoso de *A. equina* foi mais agressivo para as células AGS comparativamente ao extrato aquoso de *A. sulcata* uma vez que na concentração mais elevada que foi testada diminuiu a viabilidade para aproximadamente 3,9±0,7% contra os 61,7±4,1%, respetivamente.

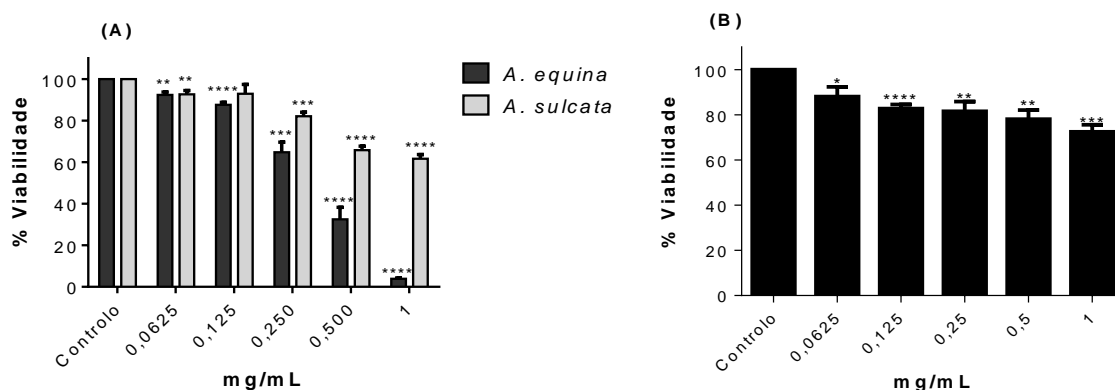


Figura 19 – Avaliação da viabilidade celular das células AGS expostas aos extratos aquosos de *A. equina* e *A. sulcata* (A) e ao composto puro homarina (B) durante 24 h. Os resultados são apresentados com a média ± erro padrão da média de 3 ensaios independentes realizados em triplicados.

A avaliação da citotoxicidade causada pelo composto puro homarina foi também efetuada de forma a correlacionar os efeitos causados pelo extrato com o perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD e estabelecer possíveis relações entre a composição química de cada um dos extratos com a respetiva atividade. Como podemos observar pelo gráfico da Figura 19(B) o composto puro homarina revelou efeitos citotóxicos menos acentuados quando comparado com os extratos aquosos, uma vez que com a concentração mais alta estudada, diminui a % de viabilidade para cerca de 72,4±5,4%.

Tendo em conta a quantificação feita da homarina em ambos os extratos, podemos afirmar que, nas concentrações em que este composto se encontra nos extratos, este não contribuiu significativamente para a atividade dos extratos observada nos gráficos da figura 19(A). Contudo, ambos os extratos possuem outros compostos que podem estar a contribuir para os efeitos citotóxicos causados pelos extratos. Além disto muitas vezes os efeitos observados podem dever-se a antagonismos e/ou sinergismos entre compostos e não à ação individual de um único composto.

4.2.2. Avaliação da integridade membranar

De forma a avaliar a integridade da membrana das células AGS expostas aos extratos e ao composto puro, a libertação de LDH para o meio extracelular foi avaliada, uma vez que a permeabilização da membrana plasmática é um fator chave para as células em necrose (180).

As células foram incubadas com triton X-100 a 1% durante 30 min de forma a lisar totalmente as células. O triton X-100 a 1% foi assim usado como controlo positivo do ensaio uma vez que as células expostas a este detergente aumentaram em $6,6 \pm 1,1$ a libertação de LDH para o meio extracelular quando comparado com as células controlo expostas unicamente a meio (Figura 20).

Como é possível observar pelo gráfico da Figura 21(A) a concentração de 1 mg/mL de extrato aquoso de *A. equina* revelou diferenças significativas na libertação de LDH para o meio extracelular comparativamente ao controlo, apresentando um aumento de $2,7 \pm 0,5$. Este resultado revela que às 24 h a concentração de 1 mg/mL de extrato aquoso de *A. equina* causa morte por necrose nas células AGS. Todas as outras concentrações tanto dos extratos como da homarina sugerem outro tipo de morte celular associada. Estes mesmos resultados (em menor intensidade) foram observados às 8 h. Assim, nas experiências subsequentes a concentração de 1 mg/mL não foi utilizada no caso do extrato de *A. equina*.

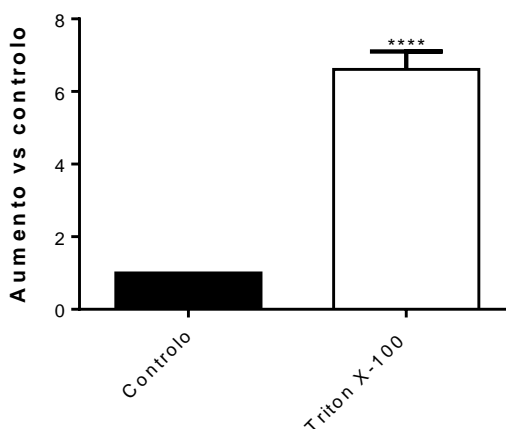


Figura 20 – Avaliação do efeito causado pelo controlo positivo triton X-100 a 1% durante 30 min na libertação de LDH para o meio extracelular. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 7 ensaios independentes realizados em triplicados.

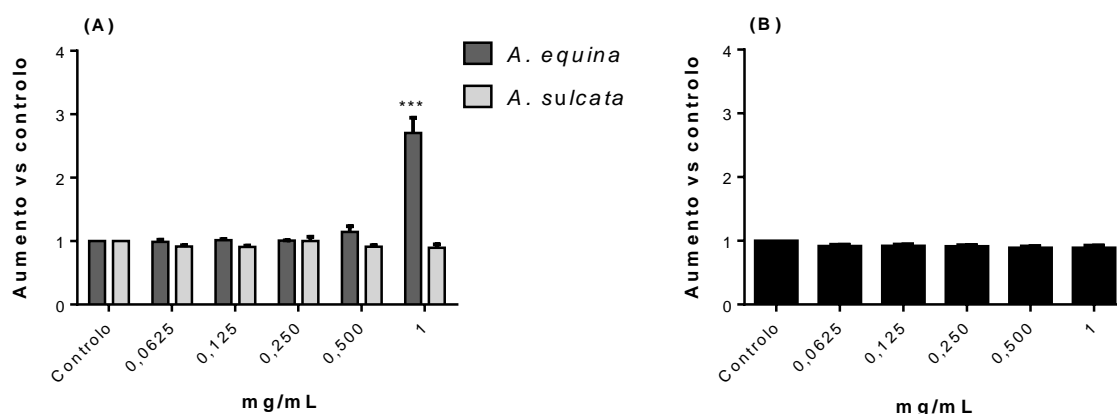


Figura 21 – Avaliação da integridade da membrana de células AGS expostas aos extratos aquosos de anêmonas-do-mar (A) e ao composto puro homarina (B) comparativamente às células controle. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 3 ensaios independentes realizados em triplicados.

4.2.3. Impacto na morfologia celular

Devido ao impacto dos extratos na viabilidade celular, a coloração de Giemsa foi utilizado para estudar as alterações morfológicas das células AGS. Após 24 h de incubação com os extratos na concentração mais alta que provocava toxicidade, mas sem revelar LDH positiva, é evidente a condensação da cromatina e uma diminuição do tamanho das células comparativamente às células do controle (Figura 22). Além disso nas células tratadas com a concentração de 0,5 mg/mL de *A. equina* foi possível observar estruturas compatíveis com corpos apoptóticos (Figura 22(C)).

Estes resultados sugerem que o mecanismo de morte pela qual os extratos estavam a causar toxicidade nas células poderia envolver um mecanismo de morte celular programada, como a apoptose.

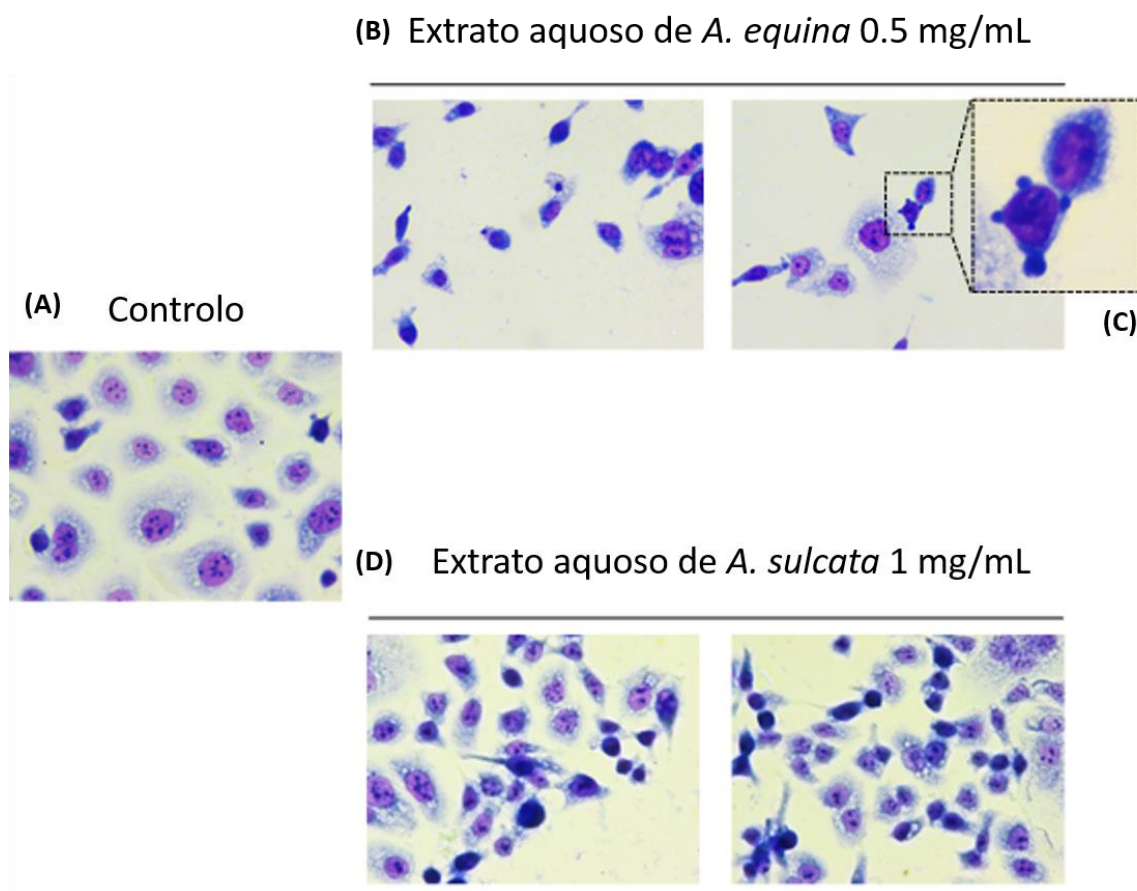


Figura 22 – Ensaio de morfologia nas células AGS tratadas com extratos durante 24 h, usando o corante de Giemsa. Em (A) e em (B) observamos os efeitos causados pelos extratos aquosos comparativamente às células controlo (A). Em (C) visualizamos numa ampliação maior células rodeadas de estruturas compatíveis à de corpos apoptóticos.

4.2.4. Atividade das caspases

Após os resultados obtidos pelo ensaio da viabilidade celular (MTT), integridade da membrana (LDH) e morfologia celular procedeu-se com a avaliação da influência das caspases na toxicidade causada pelos extratos e pelo composto puro homarina. Para tal foi usado um pan-inibidor de caspases, de forma a verificarmos se a inibição destas proteases protegia a morte celular causada pelos extratos. Para complementar este estudo, procedeu-se com um ensaio onde verificamos a ativação das caspases 3/7 na morte celular causada pelos extratos.

O Z-VAD-fmk foi preliminarmente testado como inibidor de caspases nas células em estudo em processo de morte celular por apoptose induzida por 500, 250 e 100 nM de estaurosporina (controlo positivo) ao fim de 6, 7, 8 e 9 h nas concentrações de 10, 20 e 50

μM . Este ensaio foi realizado em simultâneo com uma pré-incubação do Z-VAD-fmk de 1 e 2 h. Verificou-se que todas as concentrações de estaurosporina usadas diminuíram os níveis de viabilidade celular comparativamente às células controlo e que com a pré-incubação do Z-VAD.fmk os níveis de viabilidade celular das células tratadas com estaurosporina como indutor da apoptose aumentaram para níveis superiores aos das células tratadas apenas com estaurosporina levando assim a uma atenuação da morte celular. Após estes resultados preliminares a concentração de $50 \mu\text{M}$ de Z-VAD-fmk foi a escolhida como a melhor concentração para inibir em cerca de 20% a atividade das caspases em células tratadas com 500 nM de estaurosporina. De seguida o ensaio foi realizado em células tratadas com extratos aquosos de *A. equina* e *A. sulcata* e o composto puro homarina (Figura 23).

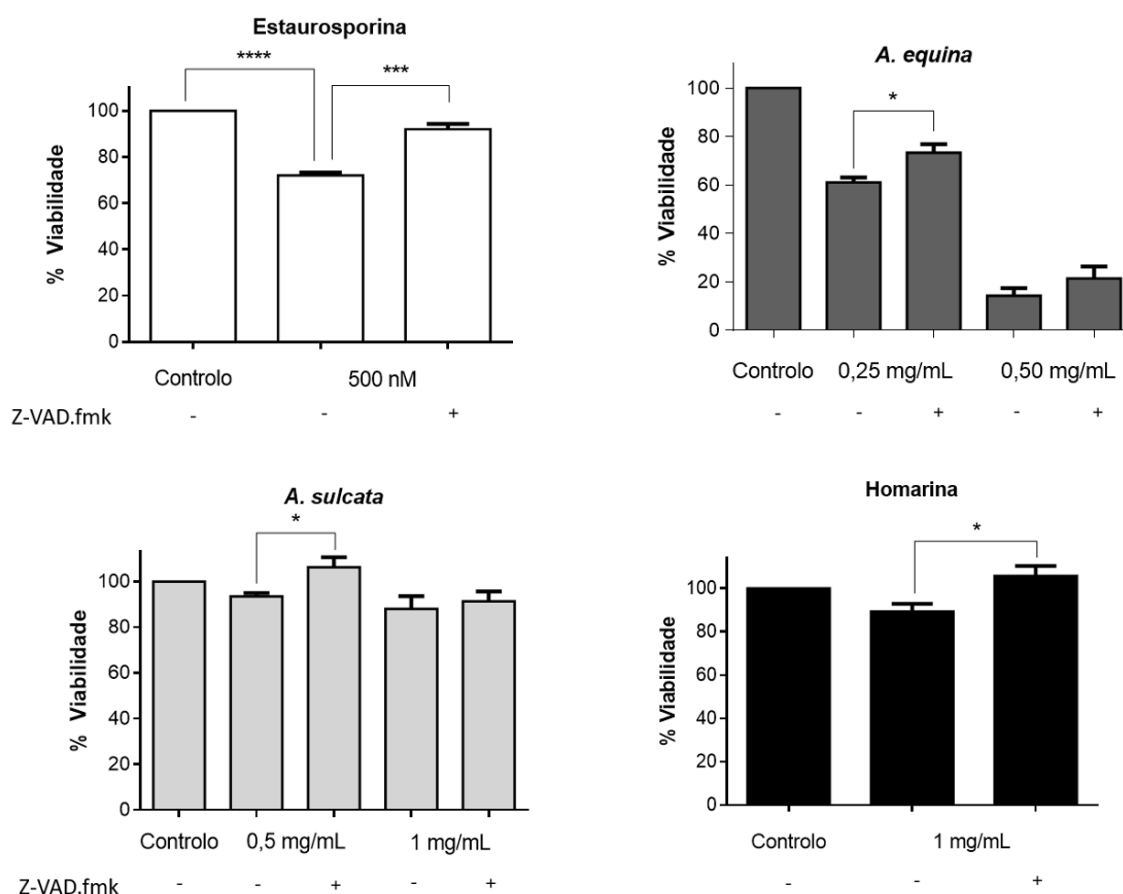


Figura 23 – Efeito do pan-inibidor de caspases Z-VAD.fmk na atenuação da morte celular de células AGS causada pelos extratos aquosos das duas espécies de anêmonas-do-mar e do composto puro homarina incubados durante 8 h. A estaurosporina foi usada a 500 nM como controlo positivo para a ativação das caspases. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados.

Controlos positivos de células não tratadas e de células tratadas com estaurosporina com e sem Z-VAD-fmk foram novamente realizados de forma a controlar a reprodutibilidade do ensaio.

Observando a Figura 23 é possível observar que a estaurosporina diminuiu a viabilidade celular comparativamente ao controlo para $72,0 \pm 2,6\%$. Observando a mesma figura é possível observar que com a pré-incubação de 1 h com o inibidor de pan-caspases Z-VAD.fmk a toxicidade causada pela estaurosporina nas células AGS foi atenuada para os $92,0 \pm 4,6\%$. Uma reversão da toxicidade causada pelos extratos aquosos de *A. equina* (0,25 mg/mL) e de *A. sulcata* (0,5 mg/mL) e pelo composto puro homarina (1 mg/mL) também foi observada quando as células foram pré-incubadas com o Z-VAD.fmk. As concentrações usadas neste ensaio, correspondem às concentrações mais altas que causavam toxicidade, mas que não mostraram LDH positiva às 8h.

Estes resultados sugerem assim o envolvimento das caspases na toxicidade provocada pelos extratos e pelo composto puro nas concentrações referidas anteriormente.

Após os resultados obtidos com o inibidor de pan-caspases Z-VAD.fmk, procedeu-se com a avaliação do contributo das caspases na toxicidade causada pelos extratos e pelo composto puro homarina através de um ensaio de luminescência para avaliar a ativação da caspase 3/7. A caspase 3 pertence a um grupo executor da apoptose que também inclui a caspase 6 e 7 (135).

A estaurosporina (500 nM) foi novamente usada como controlo positivo do ensaio e como podemos observar pela Figura 24 teve uma ativação das caspases 3/7 de cerca de 5,6 vezes $\pm 0,9$ quando comparado com o controlo. Estes resultados estão de acordo com o ensaio anteriormente obtidos com o Z-VAD.fmk.

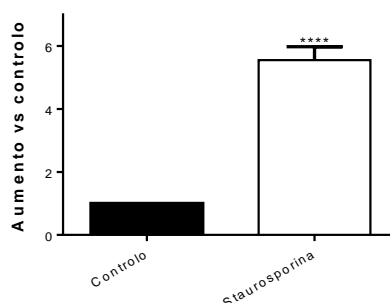


Figura 24 – Atividade das caspases 3/7 em células AGS tratadas com estaurosporina (500 nM) durante 8 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados.

Além disto, os extratos aquosos e o composto puro na concentração mais alta que causam toxicidade para as células e não apresentam LDH positiva foram testados nas mesmas condições (Figura 24).

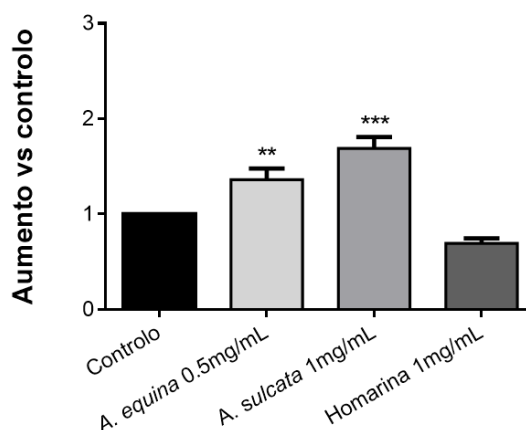


Figura 25 - Atividade das caspases 3/7 em células AGS expostas aos extratos aquosos de *A. equina* (0,5 mg/mL) e *A. sulcata* (1 mg/mL) e ao composto puro homarina (1 mg/mL) durante 8 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 3 ensaios independentes realizados em triplicados.

Ambos os extratos nas concentrações usadas revelaram diferenças significativas comparativamente ao controlo em relação ao aumento da atividade das caspases 3/7. Estes resultados não estão totalmente de acordo com o ensaio realizado anteriormente com o inibidor Z-VAD.fmk, uma vez que com as concentrações em estudo neste ensaio, o Z-VAD.fmk não conseguiu reverter a toxicidade causada pelos extratos. No caso da *A. equina* isso pode ser pelo facto de a toxicidade causada pelo extrato na concentração de 1 mg/mL ser de tal forma agressiva que na concentração que o inibidor Z-VAD.fmk foi usado, não tinha a capacidade para conseguir reverter a toxicidade observada. No caso da *A. sulcata*, uma vez que a toxicidade causada pelo extrato às 8 h é praticamente nula, o inibidor não teve a capacidade para aumentar a atividade mitocondrial das células. No caso da homarina o Z-VAD.fmk pode ter conseguido reverter a toxicidade pela ativação de alguma caspase, no entanto não significa que as 8 h tenham sido suficientes para se dar a ativação da caspase-3/7.

4.3. Efeitos biológicos em macrófagos

4.3.1. Efeitos citotóxicos

A avaliação da toxicidade provocada pelos extratos aquosos de *A. equina* e *A. sulcata* e do composto puro homarina, foi também feita na linha celular de macrófagos RAW 264.7 utilizando o método do MTT já descrito na página 53. A linha celular de macrófagos foi exposta aos extratos e ao composto puro homarina tanto na presença como na ausência de LPS (Figura 26 e Figura 27 respetivamente) de forma a definir-se qual a gama de concentrações que não provocava uma elevada toxicidade para as células. A gama de concentrações de extratos usada foi a mesma que se usou nas células do carcinoma gástrico: 0,0625 - 1 mg/mL. O estudo dos efeitos tóxicos causados pelo composto puro homarina nas mesmas concentrações, teve como finalidade a correlação dos efeitos provocados pelo extrato com os possíveis efeitos provocados pelo composto puro de forma a tentar estabelecer uma possível relação entre a composição química do extrato com a sua atividade.

Pela análise da Figura 26(A) é possível observar-se que os efeitos causados pelos extratos usando o modelo de células de macrófagos é semelhante ao verificado para as células do carcinoma gástrico, ou seja, o aumento da concentração de ambos os extratos, provoca uma diminuição da viabilidade das células sendo que essa diminuição também aqui é mais acentuada para o extrato aquoso de *A. equina*. Apesar disto os efeitos tóxicos são mais acentuados nas células AGS do que nas células RAW 264.7.

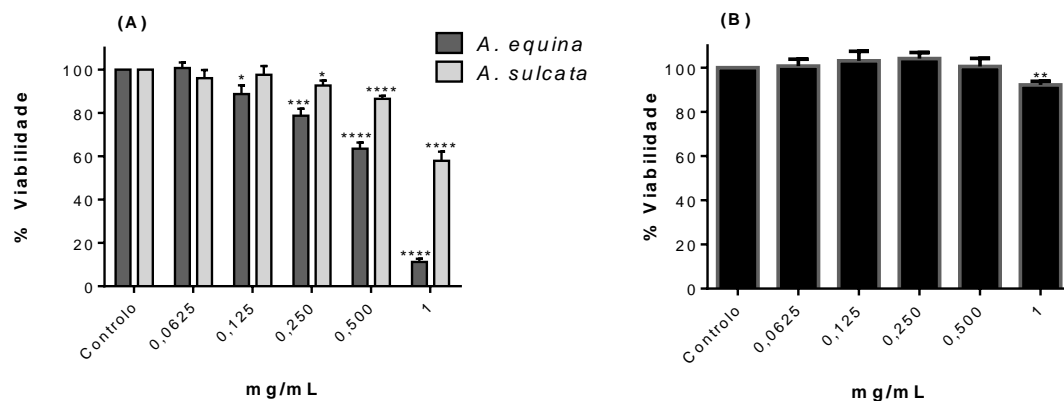


Figura 26 - Avaliação da viabilidade celular das células RAW 264.7 expostas aos extratos aquosos de *A. equina* e *A. sulcata* (A) e ao composto puro homarina (B) durante 24 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 3 ensaios independentes realizados em triplicados.

Contrariamente aos efeitos tóxicos causados pelo composto puro homarina observados nas células AGS, neste modelo de células de macrófagos a homarina apenas causa toxicidade na concentração mais alta estudada, 1 mg/mL (Figura 26(B)).

Assim, uma vez que os extratos são constituídos por uma mistura de compostos que podem atuar de forma a provocar sinergismos ou antagonismos influenciando assim a viabilidade celular, os efeitos observados dos extratos não podem ser diretamente atribuídos ao composto puro homarina. Contudo, pode dever-se à presença deste composto combinado com outros compostos presentes na matriz.

O mesmo ensaio de toxicidade foi realizado nas mesmas condições, mas na presença de LPS de forma a perceber-se se este composto provocava alguma toxicidade nas células individualmente e se quando administrado com os extratos e a homarina provocava algum tipo de sinergismos ou antagonismos que provocassem um grande aumento da diminuição da viabilidade comparativamente às células expostas apenas ao LPS (Figura 27).

Com este ensaio verificou-se que a exposição ao LPS (1 µg/mL) durante 22 h causou uma diminuição da viabilidade celular para $78,5 \pm 3,5\%$ comparativamente a células não expostas (Figura 27).

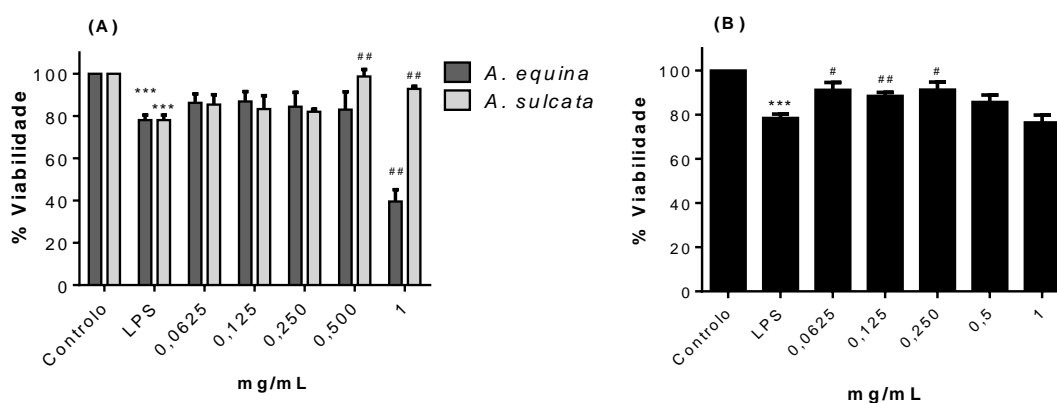


Figura 27 - Avaliação da viabilidade celular das células RAW 264.7 pré-incubadas por 2 h com os extratos aquosos de *A. equina* e *A. sulcata* (A) e o composto puro homarina (B) e de seguida expostas ao LPS (1 µg/mL) durante 22 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados. * estatística comparativamente ao controlo; # estatística comparativamente ao LPS.

Nos extratos aquosos as 2 concentrações mais altas de *A. sulcata* revelaram diferenças significativas comparativamente às células com LPS, no entanto não pela diminuição da viabilidade, mas sim por revelarem um aumento da viabilidade que se deve

a um restauro da disfunção mitocondrial. Nas restantes concentrações é possível afirmar que a diminuição da viabilidade é apenas provocada pela adição do LPS uma vez que não apresentaram diferenças significativas para com as células exposta apenas ao LPS. No caso da *A. equina* apenas a concentração mais alta revelou diferenças significativas para com as células expostas apenas ao LPS, contudo já no MTT sem exposição ao LPS, esta concentração tinha demonstrado uma eminente diminuição da viabilidade. Assim podemos afirmar que para as restantes concentrações a toxicidade observada foi apenas devida à adição do agente agressor LPS o que significa que não ocorreram sinergismos tóxicos desfavoráveis às células provocados pela junção dos extratos e do composto puro homarina com o LPS.

Em geral, a viabilidade celular não foi afetada por ambos os extratos nas concentrações entre 0,0625 – 0,25 mg/mL, tanto nos ensaios com e sem LPS. A concentração de 0,5 mg/mL de *A. sulcata* também não revelou diferenças significativas quando comparada com os respetivos controlos (com e sem LPS). O mesmo se verificou em todas as concentrações usadas de homarina. Assim os restantes ensaios foram realizados nesta gama de concentrações referidas de forma a evitar falsos positivos. ´

4.3.2. Avaliação da integridade membranar

De forma a avaliar a integridade da membrana celular das células RAW 264.7 expostas aos extratos e ao composto puro, a libertação de LDH para o meio extracelular foi avaliada. Assim foi possível avaliar a morte celular causada por necrose nas células expostas aos extratos e à homarina, uma vez que a permeabilização da membrana plasmática é uma das características das células em necrose (180).

O triton X-100 a 1% foi usado como controlo positivo do ensaio uma vez que as células expostas a este detergente aumentarem em $9,1 \text{ vezes} \pm 1,3$ a libertação de LDH para o meio extracelular quando comparado com as células controlo expostas unicamente a meio (Figura 28).

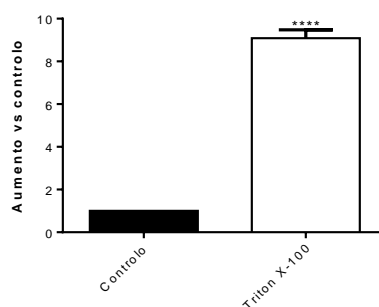


Figura 28 - Avaliação do efeito causado pelo controle positivo triton X-100 a 1% durante 30 min na libertação de LDH para o meio extracelular. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de pelo menos 4 ensaios independentes realizados em triplicados.

Este efeito tão acentuado não foi observado nas células expostas aos extratos e ao composto puro homarina, contudo, como é possível observar pelo gráfico da Figura 29 a concentração de 0,5 e 1 mg/mL de extrato aquoso de *A. equina* revelou diferenças significativas na libertação de LDH para o meio extracelular comparativamente ao controle, apresentando um aumento de 2,0 vezes \pm 0,8 e de 3,1 vezes \pm 0,8 respetivamente. Este resultado revela que às 24 h a concentração de 0,5 e 1 mg/mL de extrato aquoso de *A. equina* causa morte por necrose nas células RAW 264.7. Todas as outras concentrações tanto dos extratos como da homarina sugerem outro tipo de morte celular associada.

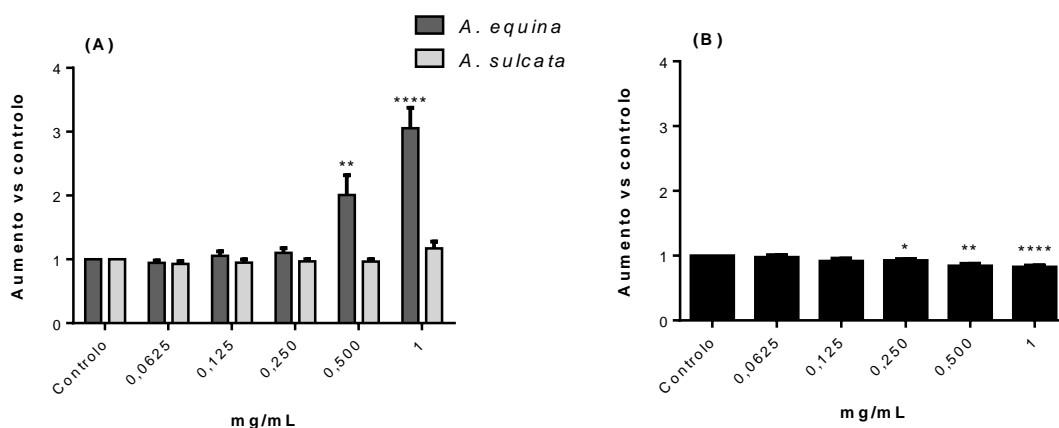


Figura 29 – Avaliação da integridade da membrana de células RAW 264.7 expostas aos extratos aquosos de anêmonas-do-mar (A) e ao composto puro homarina (B) comparativamente às células controle. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 5 ensaios independentes realizados em triplicados.

Os mesmos resultados foram observados no ensaio realizado às 8 h exceto para a concentração de 0,5 mg/mL de extrato aquoso de *A. equina*, uma vez que neste caso não se revelou LDH positiva.

4.3.3. Atividade das caspases

Com o objetivo de verificar o envolvimento das caspases no processo de morte celular de células RAW 264.7 induzida por ambos os extratos aquosos, recorreu-se a um pan-inibidor irreversível e permanente de caspases. O Z-VAD-fmk foi preliminarmente testado em células AGS e as mesmas condições foram usadas para a linha de células RAW 264.7. A concentração de 50 μ M de Z-VAD-fmk foi a escolhida como a melhor concentração para inibir cerca de 15,2% a ação das caspases em células tratadas com 500 nM de estaurosporina. De seguida o ensaio foi realizado em células tratadas com extratos aquosos de *A. equina* e *A. sulcata* e o composto puro homarina (Figura 30). Controlos positivos de células não tratadas e de células tratadas com estaurosporina com e sem Z-VAD-fmk foram novamente realizados de forma a controlar a reprodutibilidade do ensaio.

Observando a Figura 30 é possível observar que a estaurosporina diminuiu a viabilidade celular comparativamente ao controlo para $61,8 \pm 5,1\%$. Observando a mesma figura é possível observar que com a pré-incubação de 1 h com o inibidor de pan-caspases Z-VAD.fmk a toxicidade causada pela estaurosporina nas células RAW 264.7 foi revertida para os $76,9 \pm 7,3\%$. Uma reversão da toxicidade causada pelos extratos aquosos de *A. equina* (0,5 e 0,25 mg/mL) e de *A. sulcata* (0,5 mg/mL) e pelo composto puro homarina (1 mg/mL) também foi observada quando as células foram pré-incubadas com o Z-VAD.fmk.

Estes resultados sugerem assim o envolvimento das caspases na toxicidade provocada pelos extratos e pelo composto puro nas concentrações referidas anteriormente.

Após os resultados obtidos com o pan-inibidor de caspases Z-VAD.fmk, procedeu-se com a avaliação da ativação das caspases.

A estaurosporina (500 nM) foi também usada como controlo positivo, tendo causado um aumento da ativação das caspases de cerca de 2,6 vezes $\pm 0,5$ quando comparado com o controlo (Figura 31). Estes resultados estão de acordo com o ensaio anteriormente obtidos com o Z-VAD.fmk.

Os extratos aquosos nas concentrações mais altas que causam toxicidade para as células e não apresentam LDH positiva foram testados nas mesmas condições (Figura 32).

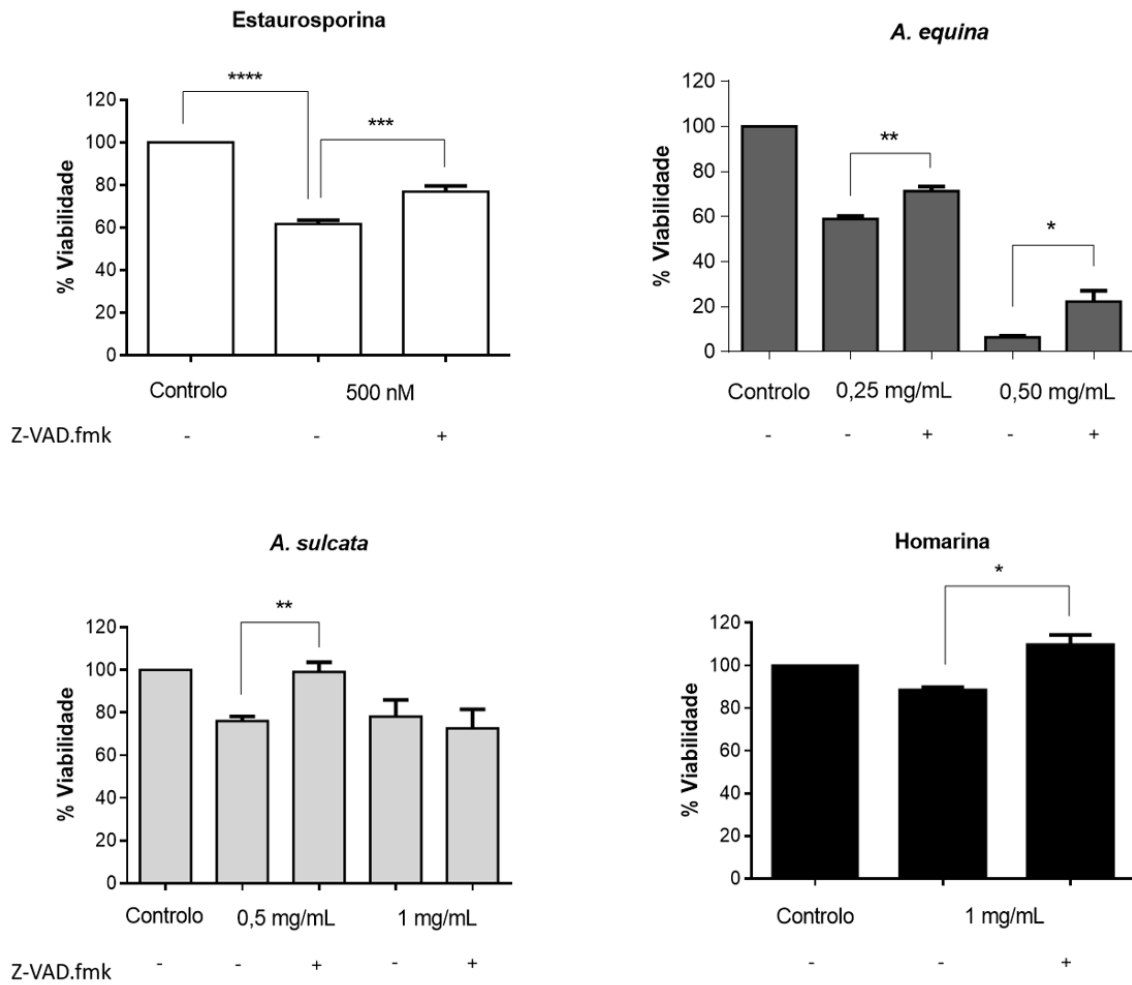


Figura 30 – Efeito do pan-inibidor de caspases Z-VAD.fmk na reversão da morte celular de células RAW 264.7 causada pelos extratos aquosos das duas espécies de anêmonas-do-mar e do composto puro homarina, incubados durante 8 h. A estaurosporina foi usada a 500 nM como controlo positivo para a ativação das caspases. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados.

Ambos os extratos nas concentrações usadas revelaram diferenças significativas comparativamente ao controlo em relação ao aumento da atividade das caspases 3/7. Estes resultados estão de acordo com o ensaio realizado anteriormente com o inibidor Z-VAD.fmk, uma vez que com as concentrações em estudo neste ensaio, o Z-VAD.fmk conseguiu reverter a toxicidade causada pelos extratos.

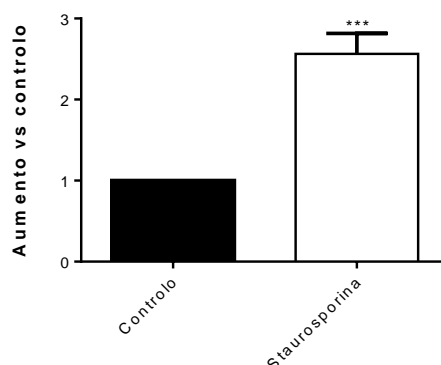


Figura 31 – Atividade das caspases 3/7 em células RAW 264.7 tratadas com estaurosporina (500 nM) durante 8 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados.

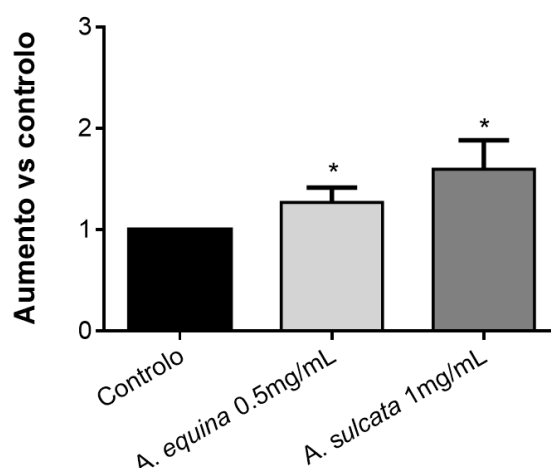


Figura 32 - Atividade das caspases 3/7 em células RAW 264.7 expostas aos extratos aquosos de *A. equina* (0,5 mg/mL) e *A. sulcata* (1 mg/mL) durante 8 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 3 ensaios independentes realizados em triplicados.

4.3.4. Diminuição da produção do $\cdot\text{NO}$

Devido à importância da procura de novos fármacos para uso na terapêutica das doenças inflamatórias, o potencial anti-inflamatório de ambos os extratos e do composto puro homarina foram avaliados na linha celular de macrófagos RAW 264.7. O estado inflamatório dos macrófagos pode ser induzido por infecções bacterianas ou estímulos imunológicos como o LPS (componente da parede celular de bactérias gram-negativas) que consegue ativar diretamente monócitos e macrófagos, levando à produção de uma

variedade de mediadores inflamatórios (6, 152). O $\cdot\text{NO}$ é uma molécula de sinalização intracelular e intercelular que está envolvida na regulação de diversos mecanismos fisiológicos e pato-fisiológicos não só no sistema imunológico, mas também cardiovascular e nervoso (6, 152). É um radical livre de curta duração que possui um papel essencial na inflamação e que, em quantidades elevadas é citotóxico para as células e como tal prejudicial para o organismo podendo mesmo levar a choque séptico, lesões cerebrais, isquemia do miocárdio, doenças inflamatórias locais ou sistêmicas, diabetes, arteriosclerose, cancro entre outras doenças, embora os mecanismos moleculares detalhados ainda são pouco clarificados (152). Assim a regulação da sua produção nos tecidos pode ser importante para o tratamento da inflamação.

Para avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos e do composto puro, foi usado um modelo de inflamação dos macrófagos usando assim o LPS. Quando em cultura celular o $\cdot\text{NO}$ é libertado pelos macrófagos e convertido em vários derivados de azoto dos quais apenas o nitrito é estável, sendo facilmente medido pelo reagente de Griess (181).

Como já descrito em outros estudos, o tratamento de células RAW 264.7 com LPS leva à indução da expressão da iNOS e a um aumento correspondente da produção do $\cdot\text{NO}$ (6, 179). Assim, a inibição da expressão e/ou atividade da iNOS, representa um objetivo terapêutico importante (152).

De forma a avaliar o efeito dos extratos e do composto puro homarina na inibição da produção de NO em células RAW, estas foram pré-incubadas com os extratos e o composto puro homarina, na ausência e na presença de LPS. O $\cdot\text{NO}$ é produzido a partir do oxigénio e do aminoácido L-arginina pela iNOS (expressa em macrófagos) durante a inflamação e a infeção (153, 181).

Estimulando as células com LPS durante as 22 h, houve um aumento de 6,0 vezes $\pm 0,9$ na produção de nitrito a partir do nível basal (Figura 33).

Assim, os níveis do $\cdot\text{NO}$, no meio de cultura foram determinados através de métodos espectrofotométricos baseados na reação de Griess. A capacidade dos extratos aquosos e do composto puro homarina diminuírem os níveis do $\cdot\text{NO}$ no meio de cultura de macrófagos estimulados com LPS encontram-se na Figura 34.

As concentrações de extratos e de composto puro usadas não são tóxicas para as células RAW 264.7 durante as 24 h de incubação o que significa que os resultados obtidos para a inibição da produção do $\cdot\text{NO}$ pelos extratos e pela homarina não são devido a morte celular.

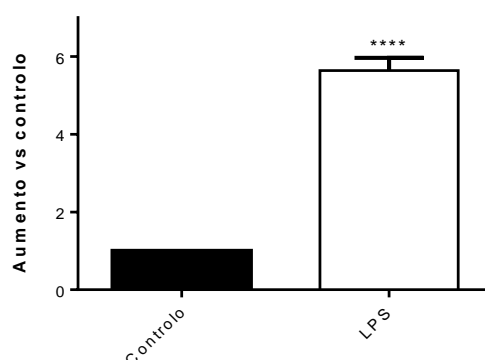


Figura 33 - Avaliação do efeito causado pelo LPS em células RAW 264.7 expostas ao agente agressor durante 22 h, na produção do $^{\bullet}\text{NO}$. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 6 ensaios independentes realizados em triplicados.

Os resultados obtidos pelo método de Griess mostraram uma diminuição dos níveis do $^{\bullet}\text{NO}$ dependente da concentração para o extrato aquoso de *A. sulcata* obtendo um IC_{50} de 0,374 mg/mL. O mesmo não aconteceu para o extrato aquoso de *A. equina* e para o composto puro homarina, apesar de ambos mostrarem diferenças significativas comparativamente ao controle com LPS em todas as concentrações estudadas.

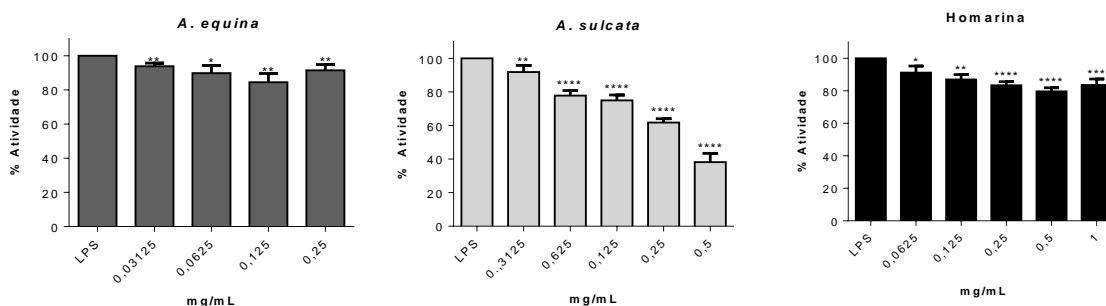


Figura 34 - Avaliação do efeito causado pelos extratos aquosos de *A. equina* e *A. sulcata* e pelo composto puro homarina na produção do $^{\bullet}\text{NO}$, em células RAW 264.7 estimuladas com LPS durante 22 h. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 5 ensaios independentes realizados em triplicados.

Quando comparamos os perfis cromatográficos percebemos que o extrato de *A. sulcata* possui um maior número de compostos comparativamente ao extrato de *A. equina* e os efeitos sinérgicos entre os compostos presentes neste extrato podem explicar a capacidade de o extrato diminuir os níveis do $^{\bullet}\text{NO}$ quando comparado com a capacidade do composto puro ou o extrato aquoso de *A. equina*. Além disto, nas células existem ações dinâmicas intracelulares e extracelulares, que podem prejudicar a capacidade dos extratos na redução do $^{\bullet}\text{NO}$.

O perfil de inibição da produção do $\cdot\text{NO}$ obtido para o extrato de *A. equina* é muito parecido ao obtido para a homarina e quando comparamos com o perfil cromatográfico deste extrato vemos que a homarina é o composto maioritário deste extrato e praticamente o único o que pode justificar estes resultados obtidos.

A capacidade do extrato de *A. sulcata* diminuir os níveis do $\cdot\text{NO}$, sugere o envolvimento deste extrato na prevenção de doenças que podem estar ligadas ao stress oxidativo, tanto usado a nível de nutracêutico como usado na alimentação.

4.3.5. Capacidade dos extratos para a diminuição da produção de EROs

As EROs resultam da ativação ou redução do oxigénio molecular ou derivados dos produtos da redução. As principais EROs são o $\text{O}_2^{\cdot-}$, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o dioxigénio singlete ($^1\text{O}_2$) e o radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Os organismos expostos ao oxigénio produzem EROs no seu metabolismo normal, contudo em situações patológicas pode ocorrer um aumento destas espécies ocorrendo o stress oxidativo. As EROs podem assim danificar todo o tipo de estruturas celulares, desde os lípidos e as membranas até ao DNA.

O radical NO consegue iniciar a apoptose das células e ainda reagir com EROs e moléculas biológicas para formar uma variedade de produtos como os nitritos, nitratos e S-nitrosotióis (181). O peróxinitrito formado na reação do $\cdot\text{NO}$ com o $\text{O}_2^{\cdot-}$, pode ser responsável por alguns efeitos citotóxicos destes radicais (181). Por este motivo, fomos avaliar a capacidade dos extratos e do composto puro homarina diminuírem a produção de EROs em células RAW 264.7 expostas ao LPS durante 22 h.

Uma vez que vários estudos revelaram aumento na produção de EROs em células imunes sujeitas a LPS, este foi usado como controlo positivo do ensaio e como agente agressor (179) levando a um aumento da produção de EROs de 3,9 vezes \pm 1,2 quando comparado com as células controlo (Figura 35).

De forma a avaliar o efeito dos extratos na diminuição da produção de EROs, as células foram pré-incubadas com os extratos e o composto puro por 2 h e de seguida adicionou-se o agente agressor LPS. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 36 e como podemos observar ambos os extratos aquosos foram capazes de prevenir a produção de EROs induzida pelo LPS.

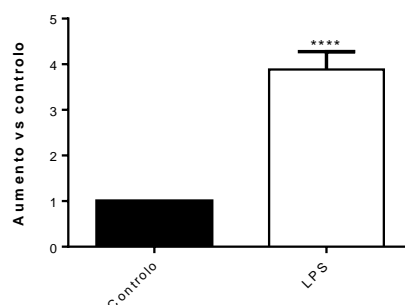


Figura 35 - Avaliação do efeito causado pelo LPS em células RAW 264.7 expostas ao agente agressor durante 22 h, na produção de EROs. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 6 ensaios independentes realizados em triplicados.

Observando a Figura 36(A) percebemos que praticamente não existem diferenças entre as atividades observadas para ambos os extratos aquosos.

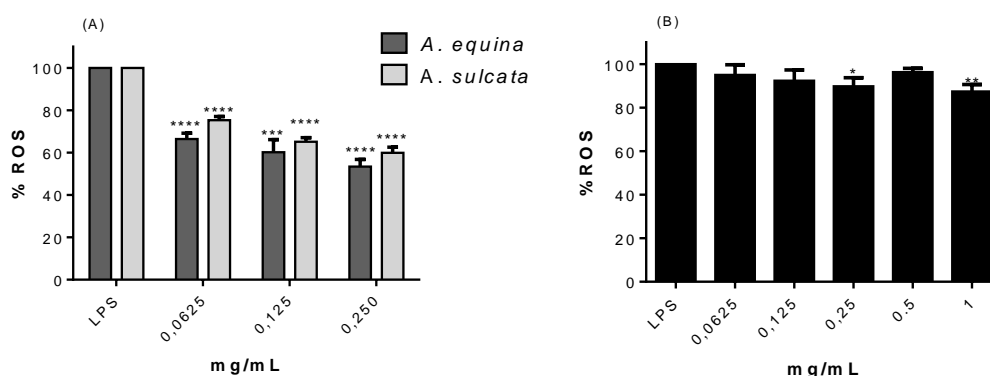


Figura 36 – Avaliação dos efeitos dos extratos aquosos de anêmonas-do-mar (A) e do composto puro homarina (B) em células estimuladas com LPS na produção de EROs intracelular. O ensaio foi realizado usando uma sonda fluorescente, a DCDHF-DA. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de 4 ensaios independentes realizados em triplicados.

4.4. Ensaios não celulares

4.4.1. Inibição da via do ácido araquidônico

A PLA₂ é uma família de enzimas que hidrolisam a ligação acil-éster na posição sn-2 de fosfolípidos libertando o AA que posteriormente serve de substrato para a COX e a LOX. É assim convertido numa família de moléculas designadas eicosanoides que incluem as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Estes compostos são categorizados como mediadores anti-inflamatórios e pro-inflamatórios e possuem várias aplicabilidades em muitas doenças inflamatórias humanas (182). Por esta razão é importante avaliar o

potencial dos extratos em estudo e do composto puro na inibição da via de libertação do ácido araquidónico das membranas com posterior produção de mediadores pro-inflamatórios. O modelo de PLA₂ usado neste estudo provem do veneno de abelha, contudo é ainda um modelo que se afasta do modelo encontrado em humanos.

Neste ensaio não celular, as concentrações usadas foram na gama dos 0,0625-1 mg/mL. Como podemos observar pela figura 37(A) ambos os extratos apresentaram diferenças significativas em todas as concentrações em estudo exceto o extrato aquoso de *A. sulcata* na concentração de 0,0625 mg/mL. Contudo o extrato aquoso de *A. equina* revelou um maior potencial para a inibição desta via na concentração mais alta em estudo. Nenhum extrato atingiu com as concentrações em estudo o valor de IC₅₀ para a inibição da via.

De forma a tentarmos correlacionar o perfil cromatográfico obtido pelo HPLC-DAD com a atividade dos extratos, o único composto identificado foi analisado na mesma gama de concentrações que os extratos. Como podemos observar pela figura 37(B) todas as concentrações em estudo mostraram diferenças significativas comparativamente ao controlo apresentando um IC₅₀ de 0,832 mg/mL, sendo que a concentração de 1 mg/mL revelou um grande potencial de inibição de cerca de 67,9±5,6%.

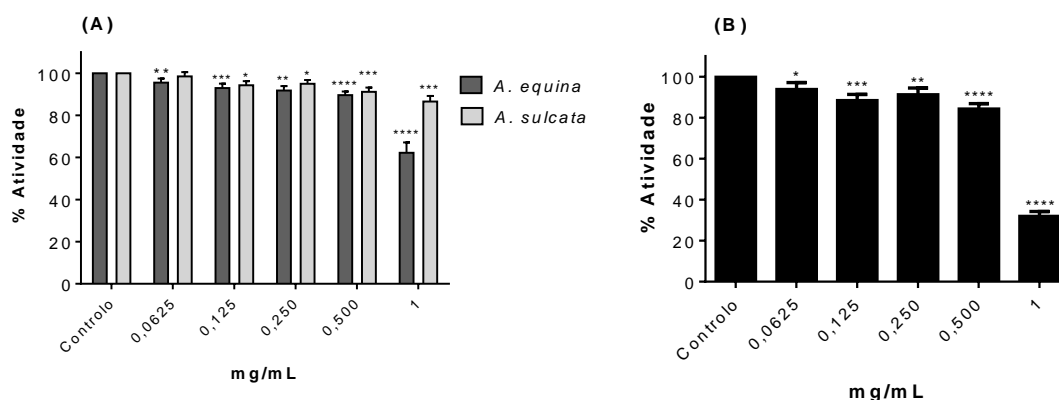


Figura 37 – Avaliação da inibição da via do ácido araquidónico pelos extratos aquosos de anêmonas-do-mar (A) e pelo composto puro homarina (B) num sistema não-celular. Os resultados são apresentados com a média ± erro padrão da média, de 4 ensaios independentes realizados em triplicados.

Tendo em conta a quantificação feita da homarina em ambos os extratos e as concentrações usadas neste ensaio, podemos afirmar que nas concentrações em que este composto se encontra nos extratos, este não contribuiu para a atividade dos extratos

observada nos gráficos da figura 37(A). Contudo estes resultados obtidos pela homarina vêm de encontro aos resultados já descritos por Aassila *et al.* no qual demonstrou 100% de inibição da PLA₂ pela homarina, usando um ensaio específico para a inibição da PLA₂ (26).

Apesar destes resultados, ambos os extratos possuem outros compostos que podem estar a contribuir para as atividades observadas pelos extratos. Além disto muitas vezes os efeitos observados podem dever-se a antagonismos e/ou sinergismos entre compostos e não à ação individual de um composto.

Capítulo 5

5. Conclusões finais e perspectivas futuras

Considerando os resultados obtidos ao longo deste trabalho prático, é possível estabelecer algumas conclusões da atividade dos extratos aquosos de anêmonas-do-mar *A. equina* e *A. sulcata*.

Através da análise cromatográfica com detecção a 280 nm dos extratos aquosos foi possível identificar o alcaloide homarina em ambos os extratos, através da co-eluição com o composto puro sintetizado. Apesar disto, detetou-se que a homarina se encontrava em maior quantidade no extrato aquoso de *A. equina*. Além disto ambos os cromatogramas demonstraram a presença de outros compostos com capacidade de absorção no mesmo comprimento de onda que a homarina, contudo não foi possível a sua detecção.

A avaliação da citotoxicidade dos extratos nos sistemas celulares revelou que ambos os extratos eram ativos, mas com comportamentos diferentes uma vez que o extrato de *A. equina* foi o mais ativo em ambos os modelos quando comparado com o extrato de *A. sulcata*. Comparativamente aos extratos, a homarina não revelou exercer grande atividade de citotoxicidade neste tipo de modelos celulares. Assim seguiu-se com o estudo do envolvimento das caspases na morte celular causada pelos extratos nas concentrações que não apresentavam LDH positiva.

Nas células AGS, primeiramente observaram-se evidências apoptóticas em ambos os extratos. De seguida realizaram-se os estudos para avaliação do envolvimento das caspases na morte celular provocada por ambos os extratos nas concentrações testadas:

- no ensaio com o pan-inibidor de caspases Z-VAD.fmk observou-se que a concentração de 0,25 mg/mL do extrato aquoso de *A. equina* e a de 0,5 mg/mL do extrato aquoso de *A. sulcata* atenuavam a morte celular das células na presença deste inibidor quando comparadas com as células não expostas ao inibidor.

- no ensaio da atividade da caspase 3/7 observou-se que a concentração de 0,5 mg/mL do extrato aquoso de *A. equina* e a de 1 mg/mL do extrato aquoso de *A. sulcata* mostravam ativação da caspase 3/7.

Com a homarina neste mesmo modelo celular observou-se uma atenuação da morte celular nas células expostas ao Z-VAD.fmk, no entanto não se observou ativação das caspases.

Nas células RAW 264.7 o envolvimento das caspases também foi observado na morte celular provocada por ambos os extratos nas concentrações testadas:

- no ensaio com o pan-inibidor de caspases Z-VAD.fmk observou-se que as concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL do extrato aquoso de *A. equina* e a de 0,5 mg/mL do extrato aquoso de *A. sulcata* atenuavam a morte celular das células na presença deste inibidor quando comparadas com as células não expostas ao inibidor.

- no ensaio da atividade da caspase 3/7 observou-se que as concentrações de 0,5 mg/mL do extrato aquoso de *A. equina* e a concentração de 1 mg/mL do extrato aquoso de *A. sulcata* mostravam ativação da caspase 3/7.

Com a homarina neste mesmo modelo celular também foi possível observar-se uma atenuação da morte celular nas células expostas ao Z-VAD.fmk, no entanto não se observou atividade das caspases.

Em relação à atividade anti-inflamatória no modelo celular das células RAW 264.7 o extrato aquoso de *A. sulcata* revelou uma maior eficácia na diminuição da produção do NO induzido pelo LPS. Contudo ambos os extratos mostraram praticamente a mesma atividade na capacidade da diminuição da produção de EROs. No caso da homarina, em relação à capacidade de diminuição do NO , esta apresentou uma atividade semelhante à do extrato aquoso de *A. equina*, sendo que não revelou grandes diferenças significativas na capacidade para diminuir a produção de EROs quando comparado com os extratos.

No modelo não-celular o extrato aquoso de *A. equina* revelou uma maior capacidade para a inibição da via do ácido araquidônico comparativamente ao outro extrato usado. A homarina revelou uma maior capacidade quando comparada com os extratos.

Após análise de todos os resultados obtidos, é possível concluir que nas concentrações de extratos usadas, a homarina não teve grande relevância para este tipo de atividades estudadas, uma vez que se encontra nos extratos em concentrações muito mais baixas do que as concentrações testadas do composto.

No futuro outros estudos serão realizados de forma a ser possível clarificar melhor a composição química de cada um dos extratos. Atualmente, estudos do envolvimento das caspase 9, 4 e 12 na morte provocado pelos extratos nas respetivas linhas celulares estão a ser realizados de forma a clarificar-se melhor o tipo de morte celular envolvido. Além disto será interessante realizar o ensaio da LOX (já otimizado no laboratório) de forma a tentar-se atribuição a atividade observada pelos extratos e pela homarina na inibição da via do ácido araquidónico à enzima LOX ou PLA₂. Será também possível continuar o trabalho de forma a realizarem-se estudos com os compostos puros e com misturas de compostos de forma a conseguir atribuir os efeitos observados pelos extratos a um único composto ou a uma mistura de compostos, no caso de ocorrerem antagonismos e/ou sinergismos entre os mesmos. Será também importante testar os mesmos extratos em outro tipo de células (como por exemplo células gástricas não cancerígenas e fibroblastos) de forma a percebermos se existe algum tipo de seletividade citotóxica associada aos mesmos. Futuramente será também interessante compreender os mecanismos envolvidos na expressão do gene iNOS, COX-2, IL-6 e TNF- α pelas células RAW 264.7 expostas aos extratos de forma a percebermos qual o mecanismo envolvido na diminuição da produção do NO .

O esclarecimento de todos estes estudos referidos anteriormente poderá ser bastante útil para a classificação destas anémonas-do-mar como sendo ou não benéficas para o consumo humano e consequentemente para a saúde humana, de forma a prosseguir-se com a incorporação destas espécies de anémonas-do-mar em suplementos alimentares e/ou alimentos.

Capítulo 6

6. Bibliografia

1. Montaser R, Luesch H. Marine natural products: a new wave of drugs? Future Medicinal Chemistry. 2011;3(12):1475-89.
2. Pereira D, Valentão P, Correia-da-Silva G, Teixeira N, Andrade P. Plant Secondary Metabolites in Cancer Chemotherapy: Where are We? Journal of Current Pharmaceutical Biotechnology. 2012;13:632-50.
3. Rocha J, Peixe L, Gomes NCM, Calado R. Cnidarians as a Source of New Marine Bioactive Compounds - An Overview of the Last Decade and Future Steps for Bioprospecting. Journal of Marine Drugs. 2011;9:1860-86.
4. Brahmachari G. Natural Products - Chemistry, Biochemistry and Pharmacology West Bengal, Índia: Alpha Science International; 2009.
5. Pereira DM, Valentão P, Teixeira N, Andrade PB. Amino acids, fatty acids and sterols profile of some marine organisms from Portuguese waters. Journal of Food Chemistry. 2013;141(3):2412-7.
6. Oliveira A, Lobo-da-Cunha A, Taveira M, Ferreira M, Valentão P, Andrade P. Digestive Gland from *Aplysia depilans* Gmelin: Leads for Inflammation Treatment. Journal of Molecules. 2015;20(9):15766-80.
7. Romero L, Marcussi S, Marchi-Salvador D, Silva F, Fuly A, Stábeli R, et al. Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A₂ from the sea anemone *Condylactis gigantea*. Journal of Biochemie. 2010;92:1063-71.
8. Gudbjarnason S. Bioactive marine natural products. Journal of the Marine Research Institute. 1999;16:107 - 10.
9. Tarrant AM, Reitzel AM, Blomquist CH, Haller F, Tokarz J, Adamski J. Steroid metabolism in cnidarians: Insights from *Nematostella vectensis*. Journal of Molecular and Cellular Endocrinology. 2009;301:27-36.

10. Cragg GM, Newman DJ. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem Rev.* 2009;8(2):313-31.
11. Nevalainen TJ, Peuravuori HJ, Quinn RJ, Llewellyn LE, Benzie JAH, Fenner PJ, et al. Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 2004;139(4):731-5.
12. Devi KN, Kumar TTA, Dhayanithi NB, Kathiresan K. Isolation of pigments from sea-anemones, *Heteractis magnifica* (Quoy and Gaimard, 1833) and *Stichodactyla haddoni* (Kent, 1893) and their effects against aquatic and human bacterial pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2012;2(1, Supplement):S323-S8.
13. Bandaranayake WM. The nature and role of pigments of marine invertebrates. *Journal of Natural Products Reports.* 2006;23:223-55.
14. Skaphandrus. Espécies Marinhas - Ordem Polypodiozoa [Available from: [http://skaphandrus.com/pt/marine-species/order/Polypodiozoa-\(Order-Unknown\)](http://skaphandrus.com/pt/marine-species/order/Polypodiozoa-(Order-Unknown))].
15. Frazão B, Vasconcelos V, Antunes A. Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Journal of Marine Drugs.* 2012;10(8):1812-51.
16. Aveiro Ud. Cnidários - Pólipo e Medusa [Available from: <http://www.biorede.pt/>].
17. Norton RS. Structures of sea anemone toxins *Journal of Toxicon.* 2009;54:1075-88.
18. Aneiros A, Garateix A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B.* 2004;803(1):41-53.
19. Honma T, Shiomi K. Peptide Toxins in Sea Anemones: Structural and Functional Aspects. *Journal of Marine Biotechnology.* 2006;8(1):1-10.
20. Norton RS. Structures of sea anemone toxins. *Toxicon.* 2009;54(8):1075-88.
21. Moura A. Cnidários 2013 [Available from: <http://biologoesperto.blogspot.pt/2013/07/cnidarios.html>].
22. Armoza-Zvuloni R, Kramarsky-Winter E, Loya Y, Schlesinger A, Rosenfeld H. Trioecy, a Unique Breeding Strategy in the Sea Anemone *Aiptasia diaphana* and Its Association with Sex Steroids. *Journal of Biology of Reproduction.* 2014;90(6).
23. Fox DL, Pantin GFA. The colour of the plumose anemone, *Metridium senile*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* 1941;230:415-50.
24. W.Gabriel. The radiate phyla 2010 [Available from: <http://blog.udn.com/Gabriel33/4188828>].
25. grupoescolar. Anêmona-do-Mar ou Actínia 2016 [Available from: <http://www.grupoescolar.com/pesquisa/anemonadomar-ou-actinia.html>].
26. Aassila H, Guyot M, El Abbouyi A, Fassouane A. Identification and anti-inflammatory activity of homarine isolated from *Anemonia sulcata*'s tentacles. *Journal of Physical and Chemical news.* 2013.

27. Souto A, Tavares J, Silva M, Diniz M, Athayde-Filho P, Filho J. Anti-inflammatory activity of Alkaloides: An update from 2000 to 2010. *Journal of Molecules*. 2011;16:8515-34.
28. Pereira DM, Valentão P, Andrade PB. Marine natural pigments: Chemistry, distribution and analysis. *Journal of Dyes and Pigments*. 2014;111(0):124-34.
29. Diana P, Cirrincione G. *Biosynthesis of Heterocycles: From Isolation to Gene Cluster*. 1 ed. Italy: Wiley; 2015.
30. Dewick PM. *Medicinal Natural Products*. In: Wiley, editor. *A Biosynthetic Approach*. United Kingdom: 3rd; 2009.
31. Zaharenko AJ, Junior WF. Substâncias Bioativas - Anémonas-do-mar. IV Curso de Inverno - Tópicos em Fisiologia Comparativa 2007.
32. Chang CWJ, Moore JC. Pigments from some marine specimens. The isolation and spectral characterization of spinochromes. *Journal of Chemical Education*. 1971;48(6):408.
33. Pandey G. *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants - A functional Genomic Perspective*. Berlim: Springer; 2014.
34. Gross H, König G. Terpenoids from Marine Organisms: Unique Structures and their Pharmacological Potential. *Phytochemistry Reviews*. 2006;5(1):115-41.
35. Suput D. *In vivo* effects of cnidarian toxins and venoms. *Journal of Toxicon*. 2009;54:1190-200.
36. Creighton J. What Is the Difference Between Venom, Poison, and Toxins? 2014 [updated 20-04-2015. Available from: <http://www.fromquarkstoquasars.com/what-is-the-difference-between-venom-poison-and-toxins/>.
37. Ravindran VS, Kannan L, Venkateshvaran K. Biological activity of sea anemone proteins: I. Toxicity and histopathology *Journal of Experimental Biology* 2010;47:1225-32.
38. Richet C. Des poisons contenus dans les tentacules des *Actinies* (congestine et thalassine). *Journal of Société de Biologie*. 1903;55:246-8.
39. Richet C. De la thalassine toxins cristallisée et pruritogène *Journal of Société de Biologie*. 1903;55:707-10.
40. Richet C. De l'action de la congestine (virus des *Actinies*) sur les lapins et de ses effects anaphylactiques. *Journal of Société de Biologie*. 1905;58:109-12.
41. Turk T, Kem WR. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Journal of Toxicon*. 2009;54(8):1031-7.
42. Bellomio A, Morante K, Barlic A, Gutiérrez-Aguirre I, Viguera A, González-Manas J. Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea*. *Journal of Toxicon*. 2009;54:869-80.
43. Moran Y, Gordon D, Gurevitz M. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels - molecular and evolutionary features. *Toxicon*. 2009;54(8):1089-101.

44. Ha LTN. Pigments of the Sea-Anemone *Isactinia olivacea* (Coelenterata, Actinozoa) Zoology Publications. 1968;46:42-6.
45. Abeloos-Parize M, Abeloos-Parize R. Sur l'origine alimentaire du pigment carotenoide d'*Actinia equina*. L CR Soc Biol. 1926;94:560-2.
46. Fabre R, Lederer E. Contributions a l'etude des lipochromes des animaux. Bull Soc Chim Biol. 1934;16:105.
47. Maoka T. Carotenoids in Marine Animals. Marine Drugs. 2011;9(2):278-93.
48. Harland AD, P. Spencer Davies, Anderson RA. Distribution of lipids between the zooxanthellae and animal compartment in th symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*: wax esters, triglycerides and fatty acids. Journal of Marine Biology. 1991;110:13-9.
49. G. AR. Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils. CRC Press. 1989;1.
50. Elmhirst R, Sharpe JS. On the colours of two sea-anemones *Actinia equina* and *Anemonia sulcata*. Journal of Biochemistry. 1919;14:48-57.
51. Matsuno T. Aquatic animal carotenoids. Fisheries Science. 2001;67(5):771-83.
52. Wang C, Kim JH, Kim SW. Synthetic biology and metabolic engineering for marine carotenoids: new opportunities and future prospects. Journal of Marine Drugs. 2014;12(9):4810-32.
53. Urich K. Comparative Animal Biochemistry New York: Springer Sciecn & Business Media; 1990.
54. Mason WT. Isolation and characterization of the lipids of the sea anemone, *Metridium senile*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism. 1972;280(4):538-44.
55. Yu S, Ye X, Chen L, Lian X-Y, Zhang Z. Polyoxygenated 24,28-epoxyergosterols inhibiting the proliferation of glioma cells from sea anemone *Anthopleura midori*. Steroids. 2014;88:19-25.
56. Lin X-y, Ishida M, Nagashima Y, Kazuo S. A polypeptide toxin in the sea anemone *Actinia equina* homologous with other sea anemone sodium channel toxins: Isolation and amino acid sequence. Journal of Toxicon. 1996;34(1):57-65.
57. Shiomi K, Qian W-H, Lin X-Y, Shimakura K, Nagashima Y, Ishida M. Novel polypeptide toxins with crab lethality from the sea anemone *Anemonia erythraea*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1997;1335(1-2):191-8.
58. Wunderer G, Eulitz M. Amino-acid sequence of Toxin I from *Anemonia sulcata*. European Journal of Biochemistry. 1978;89:11-7.
59. Wunderer G, Machleidt W, Wachter E. Toxin II from *Anemonia sulcata* - The first sequence of a coelenterate toxin. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie. 1976;357(2):239-40.

60. Martinez G, Kopeyan C, Schweitz H, Lazdunski M. Toxin III from *Anemonia sulcata*: Primary structure. FEBS Letters. 1977;84(2):247-52.
61. Scheffler J-J, Tsugita A, Linden G, Schweitz H, Lazdunski M. The amino acid sequence of toxin V from *Anemonia sulcata*. Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications. 1982;107(1):272-8.
62. Widmer H, Wagner G, Schweitz H, Lazdunski M, Wüthrich K. The secondary structure of the toxin ATX Ia from *Anemonia sulcata* in aqueous solution determined on the basis of complete sequence-specific ¹H-NMR assignments. European Journal of Biochemistry. 1988;171(1-2):177-92.
63. Wunderer G, Fritz H, Wachter E, Machleidt W. Amino-Acid Sequence of a Coelenterate Toxin: Toxin II from *Anemonia sulcata*. European Journal of Biochemistry. 1976;68(1):193-8.
64. Gendeh G, Young L, Medeiros C, Jeyaseelan K, Harvey A, Chung M. A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: Isolation, cDNA cloning, and functional expression. Journal of Biochemistry. 1997;36:11461-71.
65. Diochot S, Loret E, Bruhn T, Béress L, Lazdunski M. APETx1, a New Toxin from the Sea Anemone *Anthopleura elegantissima*, Blocks Voltage-Gated Human Ether-a-go-go-Related Gene Potassium Channels. Molecular Pharmacology. 2003;64(1):59-69.
66. Diochot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scarzello S, et al. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. The EMBO Journal. 2004;23(7):1516-25.
67. Honma T, Hasegawa Y, Ishida M, Nagai H, Nagashima Y, Shiomi K. Isolation and molecular cloning of novel peptide toxins from the sea anemone *Antheopsis maculata*. Journal of Toxicon. 2005;45(1):33-41.
68. Oliveira JS, Zaharenko AJ, Ferreira Jr WA, Konno K, Shida CS, Richardson M, et al. BclV, a new paralyzing peptide obtained from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. A comparison with the Na⁺ channel toxin BclIII. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2006;1764(10):1592-600.
69. Zaharenko AJ, Ferreira Jr WA, Oliveira JS, Richardson M, Pimenta D, Konno K, et al. Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins. Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics & Proteomics 2008;3:219-25.
70. Honma T, Kawahata S, Ishida M, Nagai H, Nagashima Y, Shiomi K. Novel peptide toxins from the sea anemone *Stichodactyla haddoni*. Peptides. 2008;29(4):536-44.
71. Minagawa S, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K. Primary structure of a potassium channel toxin from the sea anemone *Actinia equina*. FEBS Letters. 1998;427(1):149-51.

72. Wunderer G, Béress L, Machleidt W, Fritz H. Broad-specificity inhibitors from sea anemones. *Journal of Methods Enzymology*. 1976;45:881-8.
73. Schweitz H, Bruhn T, Guillemare E, Moinier D, Lancelin J, Lazdunski M. Kalicludines and Kaliseptine - Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(42):25121-6.
74. Diochot S, Schweitz H, Béress L, Lazdunski M. Sea Anemone Peptides with a Specific Blocking Activity against the Fast Inactivating Potassium Channel Kv3.4. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(12):6744-9.
75. Hasegawa Y, Honma T, Nagai H, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K. Isolation and cDNA cloning of a potassium channel peptide toxin from the sea anemone *Anemonia erythraea*. *Journal of Toxicon*. 2006;48(5):536-42.
76. Anderluh G, Macek P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Journal of Toxicon*. 2002;40:111-24.
77. Macek P, Lebez D. Isolation and characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia equina* L. *Journal of Toxicon*. 1988;26(5):441-51.
78. Anderluh G, Pungercar J, Strukelj B, Macek P, Gubensek F. Cloning, Sequencing, and Expression of Equinatoxin II. *Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;220(2):437-42.
79. Anderluh G, Krizaj I, Strukelj B, Gubensek F, Macek P, Pungercar J. Equinatoxins, pore-forming proteins from the sea anemone *Actinia equina*, belong to a multigene family. *Journal of Toxicon*. 1999;37:1391-401.
80. Pungercar J, Anderluh G, Macek P, Gubensek F, Strukelj B. Sequence analysis of the cDNA encoding the precursor of equinatoxin V, a newly discovered hemolysin from the sea anemone *Actinia equina*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1997;1341(2):105-7.
81. Norton RS, Bobek G, Ivanov J, Thomson M, Fiala-Beer R, Moritz R, et al. Purification and characterisation of proteins with cardiac stimulatory and haemolytic activity from the anemone *Actinia tenebrosa*. *Journal of Toxicon*. 1990;28:29-41.
82. Honma T, Minagawa S, Nagai H, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K. Novel peptide toxins from acrorhagi, aggressive organs of the sea anemone *Actinia equina*. *Journal of Toxicon*. 2005;46(7):768-74.
83. Kuramoto M, Arimoto H, Uemura D. Bioactive Alkaloids from the Sea: A Review. *Marine Drugs*. 2004;2(1):39.
84. Rosewat J. Tha family Pinnidae in the Indo-Pacific. *Journal of Indo-Pacific Mollusca*. 1961;1.

85. França P, Barbosa D, Silva D, Ribeiro Ê, Santana A, Santos B, et al. Indole Alkaloids from Marine Sources as Potential Leads against Infectious Diseases. *BioMed Research International*. 2014;2014.
86. R. Rane, N. Sahu, C. Shah, Karpoormath R. Marine bromopyrrole alkaloids: synthesis and diverse medicinal applications. *Current topics in Medicinal Chemistry*. 2014;14(2):253-73.
87. Guven K, Bora A, Sunam G. Alkaloid content of marine alga. I. Hordenine from *Phyllophora nervosa*. *Journal of Eczacilik Bul.* 1969;11:177-84.
88. Guven K, Bora A, Sunam G. Hordenine from the alga *Phyllophora nervosa*. *Journal of Phytochemistry*. 1970;9:1893.
89. Mathias A, Ross D, Schachter M. The distribution of 5-Hydroxytryptamine, Tetramethylammonium, Homarine, and other substances in Sea Anemones. *Journal of Physiology*. 1960;151:296-311.
90. Hoppe-Seyler. Zur Isolierung von Homarin. *Hoppe Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie*. 1933;22:105.
91. Affeld S, Wagele H, Avila C, Kehraus S, Konig G. Distribution of homarine in some Opisthobranchia. *Bonner Zoologische Beitrage*. 2006;55:181-90.
92. Carr WES, Netherton J, Gleeson RA, Derby CD. Stimulants of feeding behavior in fish: Analyses of Tissues of Diverse Marine Organisms. *Biological Bulletin*. 1996;190:149-60.
93. Berris JR. The species distribution of some naturally-occurring Quaternary Ammonium Compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1967;21:11-21.
94. Berking S. Is homarine a morphogen in the marine hydroid Hydractinia? *Roux's Archive of Development Biology*. 1986;195(33-38).
95. Berking S. Homarine (N-methylpicolinic acid) and trigonelline (N-methylnicotinic acid) appear to be involved in pattern control in a marine hydroid. *Journal of Development*. 1987;99(2):211-20.
96. Rashid MA, Gustafson KR, Boyd MR. HIV-Inhibitory Cembrane Derivatives from a Philippines Collection of the Soft Coral *Lobophytum* Species1. *Journal of Natural Products*. 2000;63(4):531-3.
97. Norton RS, Kazlauskas R. C-13 NMR-study of flexibility, an anti-inflammatory agent from a soft coral. *Journal of Experientia*. 1980;36:276-8.
98. Li G, Zhang Y, Deng Z, Van Ofwegen L, Proksch P, Lin W. Cytotoxic cembranoid Diterpenes from a soft coral *Sinularia gibberosa*. *Journal of Natural Products*. 2005;68:649-52.
99. Aceret TL, Coll JC, Uchio Y, Sammarco PW. Antimicrobial activity of the diterpenes flexibilide and sinularioidide derived from *Sinularia flexibilis* Quoy and Gaimard 1833

(Coelenterata: Alcyonacea, Octocorallia). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 1998;120(1):121-6.

100. Zong A, Cao H, Wang F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. Journal of Carbohydrate Polymers. 2012;90(4):1395-410.

101. Global Burden of Disease Cancer Collaboration FC, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, Allen C, Hansen G, Woodbrook R, Wolfe C, Hamadeh RR, Moore A, Werdecker A, Gessner BD, Te Ao B, McMahon B, Karimkhani C, Yu C, Cooke GS, Schwebel DC, Carpenter DO, Pereira DM, Nash D, Kazi DS, De Leo D, Plass D, Ukwaja KN, Thurston GD, Yun Jin K, Simard EP, Mills E, Park EK, Catalá-López F, deVeber G, Gotay C, Khan G, Hosgood HD 3rd, Santos IS, Leasher JL, Singh J, Leigh J, Jonas JB, Sanabria J, Beardsley J, Jacobsen KH, Takahashi K, Franklin RC, Ronfani L, Montico M, Naldi L, Tonelli M, Geleijnse J, Petzold M, Shrimme MG, Younis M, Yonemoto N, Breitborde N, Yip P, Pourmalek F, Lotufo PA, Esteghamati A, Hankey GJ, Ali R, Lunevicius R, Malekzadeh R, Dellavalle R, Weintraub R, Lucas R, Hay R, Rojas-Rueda D, Westerman R, Sepanlou SG, Nolte S, Patten S, Weichenthal S, Abera SF, Fereshtehnejad SM, Shiue I, Driscoll T, Vasankari T, Alsharif U, Rahimi-Movaghar V, Vlassov VV, Marcenes WS, Mekonnen W, Melaku YA, Yano Y, Artaman A, Campos I, MacLachlan J, Mueller U, Kim D, Trillini M, Eshrati B, Williams HC, Shibuya K, Dandona R, Murthy K, Cowie B, Amare AT, Antonio CA, Castañeda-Orjuela C, van Gool CH, Violante F, Oh IH, Deribe K, Soreide K, Knibbs L, Kereselidze M, Green M, Cardenas R, Roy N, Tillmann T, Li Y, Krueger H, Monasta L, Dey S, Sheikhabaehi S, Hafezi-Nejad N, Kumar GA, Sreeramareddy CT, Dandona L, Wang H, Vollset SE, Mokdad A, Salomon JA, Lozano R, Vos T, Forouzanfar M, Lopez A, Murray C, Naghavi M. The global burden of cancer 2013. JAMA Oncology. 2015;1(4):505-27.

102. Saralamma V, Nagappan A, Hong G, Lee H, Yumnam S, Raha S, et al. Poncirin induces Apoptosis in AGS Human Gastric Cancer Cells through extrinsic apoptotic pathway by up-regulation of Fas Ligand. International Journal of Molecular Sciences. 2015;16:22676-91.

103. World Health Organization. Cancer 2015 [Available from: <http://www.who.int/cancer/en/>].

104. Regateiro F. Manual de Genética Médica. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra; 2003.

105. Li Y-X, Himaya S, Kim S-K. Triterpenoids of Marine Origin as Anti-Cancer Agents. Journal of Molecules. 2013;18(7):7886-909.

106. Sjöström J, Bergh J. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. British Medical Journal. 2001;322:1538-9.

107. Naveen K, Shikha S, Cijo G, Suresh P, Ashok K. Anticancer and anti-metastatic activities of RHEUM EMODI rhizome chloroform extracts. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2012;3:189-94.
108. Khan KH, Blanco-Codesido M, Molife LR. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2014;90:200-19.
109. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ : British Medical Journal*. 2001;322(7301):1536-8.
110. Flam F. Chemical prospectors scour the seas for promising drugs. *Journal of Science*. 1994;266(5189):1324-5.
111. D'Incalci M, Galmarini C. A review of Trabectedin (ET-743): A unique mechanism of action. *Journal of Molecular Cancer Therapeutics*. 2010;9(8):2157-63.
112. Cuevas C, Francesch A. Development of Yondelis[registered sign] (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Natural Product Reports*. 2009;26(3):322-37.
113. Young B, O'Dowd G, Woodford P. Wheater's - Functional Histology: A text and colour atlas. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2014.
114. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Journal of Carcinogenesis*. 2000;21(3):485-95.
115. Petit PX, Susin S-A, Zamzami N, Mignotte B, Kroemer G. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *Journal of FEBS Letters*. 1996;396(1):7-13.
116. Koch A, Roth W, Steffek TM, Dengler TJ, Haass M, Karck M, et al. Impact of Apoptosis in Acute Rejection Episodes After Heart Transplantation: Immunohistochemical Examination of Right Ventricular Myocardial Biopsies. *Transplantation Proceedings*. 2008;40(4):943-6.
117. Wong R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2011;30(1):87.
118. Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(24):12736-7.
119. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007;32(1):37-43.
120. Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. New York: Garland Science; 2002.
121. Lockshin R, William C. Programmed cell death. 3. Neural control of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*. 1965;11:601-10.
122. Lockshin R, William C. Programmed cell death. 4. The influence of drugs on the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*. 1965;11:803-9.

123. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972;26:239-57.
124. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer Therapy. *Cancer*. 1994;73(8):2013-26.
125. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
126. Martin J, Reutelingsperger P, McGahon J, Rader A, Schie Cv, LaFace M, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of Experimental Medicine*. 1995;182(5):1545-56.
127. Wyllie AH, Bellamy CO, Bubbs VJ, Clarke AR, Corbet S, Curtis L, et al. Apoptosis and carcinogenesis. *British journal of cancer*. 1999;80 Suppl 1:34-7.
128. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell*. 2010;37(3):299-310.
129. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*. 1994;15(1):7-10.
130. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 1993;75(2):241-51.
131. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Journal of Science*. 1993;262(5137):1274-7.
132. Ashkenazi A, Herbst RS. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(6):1979-90.
133. Grivicich I, Regner A, Rocha A. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007;53(3):335-45.
134. Solá S, Pedro T, Ferreira H, Rodrigues C. Apoptose: Uma questão de vida ou de morte. In: FFUL CdPM-, editor. Lisboa2001.
135. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
136. Sakamaki K, Satou Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of Fish Biology*. 2009;74(4):727-53.
137. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Journal of Oncogene*. 2008;27:6194-206.
138. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):277-88.
139. Yang B, El Nahas AM, Fisher M, Wagner B, Huang L, Storie I, et al. Inhibitors Directed towards Caspase-1 and -3 Are Less Effective than Pan Caspase Inhibition in

- Preventing Renal Proximal Tubular Cell Apoptosis. *Nephron Experimental Nephrology*. 2004;96(2):e39-e51.
140. Ortiz L. Chronicles of a Silent Death: Apoptosis. *Research in Cell Biology*. 2012;1(1):1-7.
 141. Elkholi R, Floros KV, Chipuk JE. The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment. *Genes & Cancer*. 2011;2(5):523-37.
 142. Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *The EMBO Journal*. 2001;20(23):6627-36.
 143. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of Virology*. 1993;67(4):2168-74.
 144. Pop C, Salvesen GS. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(33):21777-81.
 145. Blankenberg F. *In Vivo* Detection of Apoptosis. *Journal of Nuclear Medicine*. 2008;49(2):815-955.
 146. Pomin VH. Sulfated glycans in inflammation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;92:353-69.
 147. Pereira D, Correia-da-Silva G, Valentão P, Teixeira N, Andrade P. Anti-inflammatory Effect of Unsaturated Fatty Acids and Ergosta-7,22-dien-3-ol from *Marthasterias glacialis*: Prevention of CHOP-Mediated ER-Stress and NF- κ B Activation. *Journal of PLoS ONE*. 2014;9(2):e88341.
 148. Bogatcheva NV, Sergeeva MG, Dudek SM, Verin AD. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvascular Research*. 2005;69(3):107-27.
 149. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.
 150. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Journal of Nutrition reviews*. 2010;68(5):280-9.
 151. Nagatoshi F, Kazuo K. Macrophages in Inflammation. *Current Drug Target - Inflammation & Allergy*. 2005;4(3):281-6.
 152. Chiou W-F, Chen C-F, Lin J-J. Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. *British Journal of Pharmacology*. 2000;129(8):1553-60.
 153. Moita E, Gil-Izquierdo A, Sousa C, Ferreres F, Silva LR, Valentão P, et al. Integrated Analysis of COX-2 and iNOS Derived Inflammatory Mediators in LPS-Stimulated RAW Macrophages Pre-Exposed to *Echium plantagineum* L. Bee Pollen Extract. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e59131.

154. More SV, Kumar H, Kim IS, Song S-Y, Choi D-K. Cellular and Molecular Mediators of Neuroinflammation in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013:952375.
155. Olajide OA, Bhatia HS, de Oliveira ACP, Wright CW, Fiebich BL. Inhibition of Neuroinflammation in LPS-Activated Microglia by Cryptolepine. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*. 2013;2013:459723-33.
156. Soliman M, Puig K, Combs C, Rosenberger T. Acetate reduces microglia inflammatory signaling *in vitro*. *Journal of Neurochemistry*. 2012;123(4):555-67.
157. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*. 2005;446(5):475-82.
158. Calder PC. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;83(6):S1505-19S.
159. Fagundes LA. Omega-3 e Omega-6: Editora AGE Ltda; 2002.
160. Dunbar BS, Bosire RV, Deckelbaum RJ. Omega 3 and omega 6 fatty acids in human and animal health: An African perspective. *Journal of Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014;398:69-77.
161. Wood KE, Lau A, Mantzioris E, Gibson RA, Ramsden CE, Muhlhausler BS. A low omega-6 polyunsaturated fatty acid (n-6 PUFA) diet increases omega-3 (n-3) long chain PUFA status in plasma phospholipids in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 2014;90:133-8.
162. MacArtain P, Gill C, Brooks M, Campbell R, Rowland I. Nutritional value of edible seaweeds. *Journal of Nutrition reviews*. 2007;65(12):535-43.
163. El-Badry AM, Graf R, Clavien P-A. Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver? *Journal of Hepatology*. 2007;47(5):718-25.
164. Kaisin M, Braekman JC, Daloze D, Tursch B. Novel acetoxycapnellenes from the alcyonacean *Capnella imbricata*. *Journal of Tetrahedron*. 1985;41:1067-72.
165. Bishara A, Rudi A, Goldberg I, Benayahu Y, Kashman Y. Novaxenicins A-D and xeniolides I-K, seven new diterpenes from the soft coral *Xenia novaebritanniae*. *Journal of Tetrahedron*. 2006;62(51):12092-7.
166. Fontana A, Ciavatta ML, Cimino G. Cladocoran A and B: Two novel γ -hydroxybutenolide sesterterpenes from the Mediterranean coral *Cladocora cespitosa*. *Journal of Organic Chemistry*. 1998;63:2845-1849.
167. Abbouyi AE. Identification and anti-inflammatory activity of homarine isolated from *Anemonia sulcata*'s tentacles. *Physical and Chemical News*. 2013;70(1).
168. Bellik Y, Boukraâ L, Alzahrani H, Bakhotmah B, Abdellah F, Hammoudi S, et al. Molecular Mechanism Underlying Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Activities of Phytochemicals: An Update. *Molecules*. 2013;18(1):322.

169. Heo S-J, Yoon W-J, Kim K-N, Ahn G-N, Kang S-M, Kang D-H, et al. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(8–9):2045-51.
170. Celeromics. Cell Counting with Neubauer Chamber 2010 [
171. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays *Journal of Immunological Methods*. 1983;65:55-63.
172. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry*. 1997;69(2):581-93.
173. Datki Z, Juhász A, Gálfi M, Soós K, Papp R, Zádori D, et al. Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells. *Brain Research Bulletin*. 2003;62(3):223-9.
174. Cardoso S, Santos S, Swerdlow R, Oliveira C. Functional mitochondria are required for amyloid β -mediated neurotoxicity. *The FASEB Journal*. 2001;29(9).
175. Davis L. Dimethyl sulfoxide. *Journal of American Veterinary Medical*. 1984;185:1011-4.
176. van Meerloo J, Kaspers GL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Cree IA, editor. *Cancer Cell Culture. Methods in Molecular Biology*. 731: Humana Press; 2011. p. 237-45.
177. Wan H, Williams R, Doherty P, Williams D. A study of cell behaviour on the surfaces of multifilament materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1997;8:45-51.
178. Welsh J, Prock P. Quaternary ammonium bases in the coelenterates. *Journal of Biological Bulletin*. 1958;115(3):551-61.
179. Chuang DY, Chan M-H, Zong Y, Sheng W, He Y, Jiang JH, et al. Magnolia polyphenols attenuate oxidative and inflammatory responses in neurons and microglial cells. *Journal of Neuroinflammation*. 2013;10:15-.
180. Chan FK-M, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity. In: Snow LA, Lenardo JM, editors. *Immune Homeostasis: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p. 65-70.
181. Rebelo MJ, Sousa C, Valentão P, Rego R, Andrade PB. Phenolic profile of Douro wines and evaluation of their NO scavenging capacity in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*. 2014;163:16-22.
182. Pereira R, Taveira M, Valentão P, Sousa C, Andrade P. Fatty acids from edible sea hares: anti-inflammatory capacity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells involves iNOS modulation. *RSC Advances*. 2015;5:8981-7.

Capítulo 7

7. Anexos

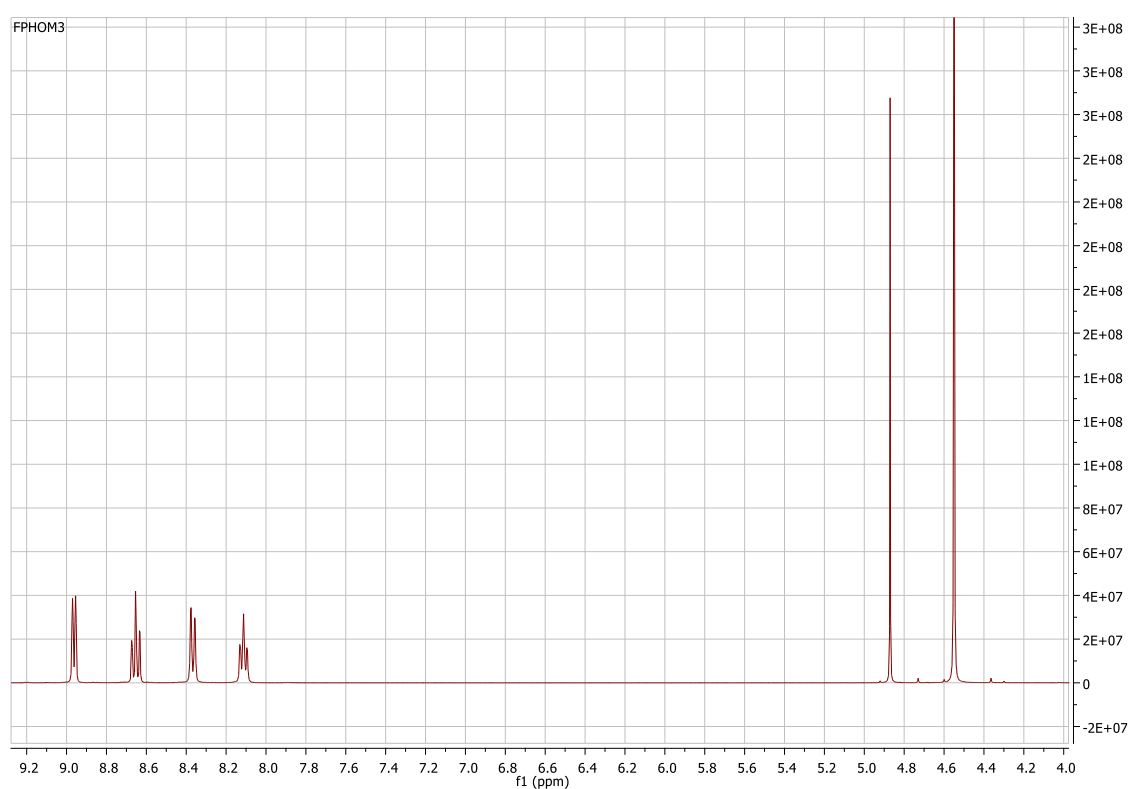


Figura 38 – Espetro de RMN do composto puro homarina obtido por síntese.